

REPTILIEN-HÄMOGLOBINE

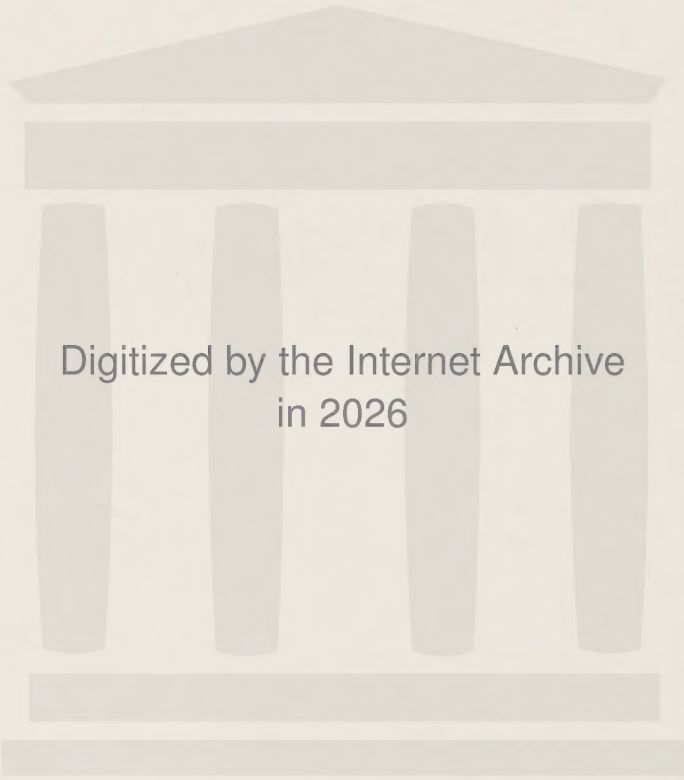
Primärstruktur der Hämoglobine und
Expression der Globingene

Untersuchungen an
der Zierschildkröte (*Chrysemys picta bellii*)
der Krötenkopfschildkröte (*Phrynops hilarii*)
und dem Grünen Leguan (*Iguana iguana*).

Karl Peter Rücknagel

*Diss
München
1985*





Digitized by the Internet Archive
in 2026

REPTILIEN-HÄMOGLOBINE

Primärstruktur der Hämoglobine und Expression der Globingene

Untersuchungen an
der Zierschildkröte (*Chrysemys picta bellii*),
der Krötenkopfschildkröte (*Phrynops hilarii*)
und dem Grünen Leguan (*Iguana iguana*).

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Karl Peter Rücknagel
aus Peiting
1984

1. Referent: Prof. Dr. G. Braunitzer

2. Referent: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1985

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Zeit von Oktober 1981 bis November 1984 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer für die Ermöglichung der Arbeit, für seine Unterstützung und seine Anregungen.

Herrn Prof. Dr. N. Heisler (Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) danke ich für die Bereitstellung der Erythrozyten von *Chrysemys picta bellii*, Herrn Prof. Dr. E. Reischl (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasilien) für das Hämolysat von *Phrynosoma marmoratus*.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie möchte ich mich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, bei Herrn A. Stangl und Frl. E. Müller für die sorgfältige Arbeit am Analysator, bei Frau B. Schrank, Herrn C. Krombach und Frl. R. Gautsch für die zuverlässige Arbeit am Sequencer bedanken.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

I N H A L T

I. E I N L E I T U N G	1
II. M E T H O D E N	4
1. G E W I N N U N G D E S B L U T E S , H A M O L Y S E , T I T E R B E S T I M M U N G , K O M P O N E N T E N T R E N N U N G , H A M A B S P A L T U N G	4
1.1 C H R Y S E M Y S P I C T A B E L L I I	4
1.1.1 H a m o g l o b i n g e w i n n u n g	4
1.1.2 T i t e r b e s t i m m u n g	4
1.1.3 K o m p o n e n t e n t r e n n u n g	5
1.1.4 H a m a b s p a l t u n g n a c h R o s s i - F a n e l l i	5
1.1.5 H a m a b s p a l t u n g n a c h T e a l e	6
1.2 P H R Y N O P S H I L A R I I	6
1.2.1 H a m o g l o b i n g e w i n n u n g	6
1.2.2 H a m a b s p a l t u n g	7
1.3 I G U A N A I G U A N A	7
1.3.1 B l u t a b n a h m e	7
1.3.2 H a m o l y s e	7
1.3.3 T i t e r b e s t i m m u n g	8
1.3.4 K o m p o n e n t e n t r e n n u n g e n	8
1.3.5 H a m a b s p a l t u n g	9
2. K E T T E N T R E N N U N G E N	9
2.1 C H R Y S E M Y S P I C T A B E L L I I	9
2.1.1 a) K e t t e n t r e n n u n g a n C M 52 C e l l u l o s e	9
2.1.2 b) I s o l i e r u n g v o n α^D -K e t t e n m i t t e l s H P L C	11
2.2 P H R Y N O P S H I L A R I I	12
2.2.1 I s o l i e r u n g d e r α^D -K e t t e n	12
2.3 I G U A N A I G U A N A	13
2.3.1 K e t t e n t r e n n u n g a n C M 52 C e l l u l o s e	13
3. E L E K T R O P H O R E S E N	13
3.1 D i s k - G e l e l e k t r o p h o r e s e	13
3.2 T r i t o n - G e l e l e k t r o p h o r e s e	14
3.3 D ü n n s c h i c h t - E l e k t r o p h o r e s e	15
4. O X I D A T I O N , R E D U K T I O N , C I T R A C O N Y L I E R U N G	16
4.1 O x i d a t i o n	16

4.2	Reduktion	16
4.3	Citraconylierung	16
5.	ENZYMATISCHE UND CHEMISCHE SPALTUNGEN	17
5.1	CHRYSEMYS PICTA BELLII, α^A -KETTEN	17
5.1.1	Tryptische Spaltung	17
5.1.2	Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	18
5.2	CHRYSEMYS PICTA BELLII, α^D -KETTEN	18
5.2.1	Tryptische Spaltung	18
5.2.2	Limitiert tryptische Spaltung an den Argininen	19
5.2.3	Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	19
5.3	CHRYSEMYS PICTA BELLII, β -KETTEN	20
5.3.1	Tryptische Spaltung	20
5.3.2	Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	20
5.4	PHRYNOPS HILARII, α^D -KETTEN	20
5.4.1	Tryptische Spaltung	20
5.4.2	Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	21
5.4.3	Spaltung an den Methioninen mit Bromcyan	21
5.5	IGUANA IGUANA α -KETTEN	22
5.5.1	Tryptische Spaltung	22
5.5.2	Spaltung am Methionin mit Bromcyan	22
5.6	IGUANA IGUANA β -KETTEN	23
5.6.1	Tryptische Spaltung	23
6.	ISOLIERUNG DER PEPTIDE	23
6.1	Gelfiltration	23
6.2	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	24
6.3	Dünnschichtelektrophorese	26
7.	ANALYSEN	26
8.	SEQUENZ	27

III. E R G E B N I S S E	29
9. CHRYSEMYS PICTA BELLII (Zierschildkröte)	29
9.1 TRENNUNG DER KOMPONENTEN	29
9.2 KETTENTRENNUNG	30
9.3 α^A -KETTEN	34
9.3.1 Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide	34
9.3.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung und Isolierung der Peptide	40
9.4 α^D -KETTEN	42
9.4.1 Tryptische Spaltung nativer Ketten und Isolierung der Peptide	42
9.4.2 Tryptische Spaltung oxidierter Ketten und Isolierung der Peptide	47
9.4.3 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	49
9.4.4 Limitierte tryptische Spaltung an den Argininen	50
9.5 β -KETTEN	52
9.5.1 Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide	52
9.5.2 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	56
10. PHRYNOPS HILARII (Krötenkopfschildkröte)	66
10.1 ISOLIERUNG DER α^D -KETTEN	66
10.2 α^D -KETTEN	68
10.2.1 Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide	68
10.2.2 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung	73
10.2.3 Bromcyan-Spaltung	74
11. IGUANA IGUANA (Grüner Leguan)	80
11.1 KOMPONENTENTRENNUNGEN	80
11.2 KETTENTRENNUNG	82
11.3 α -KETTEN	84
11.3.1 Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide	84
11.3.2 Bromcyan-Spaltung	87
11.4 β -KETTEN	89
11.4.1 Tryptische Spaltung und Trennung der Peptide	89

IV. D I S K U S S I O N	96
12. CHRYSEMYS PICTA BELLII	96
13. PHRYNOPS HILARII	105
14. IGUANA IGUANA	106
15. ALLOSTERISCHE KONTROLLE DER SAUERSTOFFAFFINITÄT	112
16. DIE α^D -KETTEN	114
16.1 Strukturmerkmale der α^D -Ketten	115
16.2 Verbreitung von α^D -Genen	117
16.3 α^D -Ketten, eine Persistenz embryonaler Gene?	118
17. EVOLUTION	119
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	130
VI. L I T E R A T U R	133

ANALYSENTABELLEN:

CHRYSEMYS PICTA BELLII	α^A -Ketten	58
" " "	α^D -Ketten	60
" " "	β -Ketten	62
PHRYNOPS HILARII	α^D -Ketten	77
IGUANA IGUANA	α -Ketten	91
" "	β -Ketten	93

SEQUENZEN:

CHRYSEMYS PICTA BELLII	64
PHRYNOPS HILARII	79
IGUANA IGUANA	95

Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat

CBp = Bromcyanpeptid

CM- = Carboxymethyl-

DEAE- = Diethylaminoethyl-

DPG = 2,3-Bisphosphoglycerat

DTE = 1,4-Dithioerytrit

GTP = Guanosintriphosphat

Hb = Hämoglobin

Hp = Hydrolytisches Peptid

HPLC = Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

IPP = Inosit-1,3,4,5,6-pentaphosphat

p50 = Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins

pO₂ = Sauerstoffpartialdruck

Propin = 3-Diethylaminopropin

PTH = Phenylthiohydantion

Quadrol = N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin

Reagenz I = 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure, Natrium-salz

Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,2,5-trisulfonsäure, Trinatriumsalz

RP = reversed phase (Umkehrphase)

Seph. = Sephadex

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFA = Trifluoressigsäure

Tp = Tryptisches Peptid (numeriert wie bei Humanhämoglobin)

TPCK = (N-Tosyl-L-phenylalanyl)chlormethan

Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

D = Asp = Asparaginsäure

N = Asn = Asparagin

Asx = Asp oder Asn

T = Thr = Threonin

S = Ser = Serin

E = Glu = Glutaminsäure

Q = Gln = Glutamin

Glx = Glu oder Gln

G = Gly = Glycin

A = Ala = Alanin

P = Pro = Prolin

C = Cys = Cystein

V = Val = Valin

M = Met = Methionin

I = Ile = Isoleucin

L = Leu = Leucin

Y = Tyr = Tyrosin

F = Phe = Phenylalanin

H = His = Histidin

K = Lys = Lysin

R = Arg = Arginin

W = Trp = Tryptophan

I. E I N L E I T U N G

Die vergleichende Untersuchung menschlicher und tierischer Hämoglobine hat zu wesentlichen Erkenntnissen auf den Gebieten der molekularen Biologie, der Biochemie und der Genetik geführt. An wohl kaum einem anderen Biomolekül wurden Funktions-Strukturbeziehungen so eingehend studiert wie am Hämoglobin. Große Unterschiede der Primärstruktur dieses funktionellen Eiweißstoffes stehen einer erstaunlichen Invarianz der Tertiärstruktur gegenüber. Geringe Veränderungen der Sequenz der Globinketten bewirken jedoch oft weit voneinander abweichende physiologische Eigenschaften der Hämoglobine verschiedener Spezies.

Man erkannte, daß der Sauerstofftransport des Hämoglobins der allosterischen Kontrolle durch andere Liganden als Sauerstoff unterliegt. Dabei entwickelten die Spezies im Lauf der Evolution unterschiedliche Mechanismen, die eine Anpassung an immer neue Lebensräume ermöglichten. Auf verblüffend einfache Weise erfolgt die Regulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bei den Crocodylia: Nicht organische Phosphate wie bei den meisten Vertebraten, sondern Hydrogencarbonationen als direktes Stoffwechselprodukt stehen in Wechselwirkung mit dem Sauerstoff. Die Strukturanalyse der Hämoglobine erlaubte die Erklärung dieses Phänomens auf molekularer Ebene. Die Frage nach der Situation bei anderen Reptilien lag nahe. Die vorliegende Arbeit soll eine Antwort darauf geben.

Die Genetik der Eukaryonten erfuhr wertvolle Anstöße von proteinanalytischen Erkenntnissen, die am Hämoglobin gewonnen wurden. In diesem Context ist besonders die Ent-

deckung der Genduplikation hervorzuheben. Nicht nur α - und β -Globinketten sondern auch distinkte embryonale, foetale und adulte Globine haben ihren Ursprung in diesen Evolutionsereignissen. α^A - und α^D -Ketten der Vogelhämoglobine sind Produkt einer vor vermutlich 400 Millionen Jahren stattgefundenen Duplikation des α -Globingens. Das Vorkommen von α^D -Ketten bei embryonalen und adulten Vögeln führte zur Frage nach der Persistenz embryonaler Globingene bei Vögeln und den daraus erwachsenden adaptiven Vorteilen. In der vorliegenden Untersuchung an Reptilienhämoglobinen wird gezeigt, daß α^D -Gene keineswegs, wie bisher angenommen, nur bei Vögeln gefunden werden, sondern auch bei Schildkröten. Überraschenderweise gibt es aber keinen Hinweis auf α^D -Gene bei Reptilien, die als phylogenetisch jünger gelten.

Der Vergleich der Primärstrukturen homologer Proteine gibt Aufschluß über die Evolution der Moleküle und der sie codierenden Gene und damit über Verwandtschaftsverhältnisse im Tierreich. Hier ist es neben wenigen anderen Proteinen vor allem das Hämoglobin, dessen umfangreiche Strukturdaten die Grundlage für die Berechnung phylogenetischer Stammbäume liefern. Solche Analysen sind besonders wertvoll wo aufgrund lückenhafter Fossildokumente die Paläontologie alleine kein gesichertes Bild der Artenentwicklung zu erstellen vermag. Reptilien verkörpern die Vorstufe der heute lebenden höheren Vertebraten (Säuger und Vögel). Ein großes Interesse der Forschung gilt daher dem Verständnis der Verwandtschaften zwischen Reptilienordnungen und deren Stellung zu anderen Amnioten. Bisher waren von Reptilien nur die vollständigen Primärstrukturen von Globinen der Crocodylia sowie die der

α -Ketten einer Schlange bekannt.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Sequenzaufklärung der Hämoglobine von Reptilien weiterer Ordnungen sollte die Grundlage geschaffen werden für eine künftige vergleichende Analyse der Atmung auf molekularbiologischer Basis, nicht zuletzt auch um die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Amniotengruppen zu erhellen.

II. METHODEN

1. GEWINNUNG DES BLUTES, HAMOLYSE, TITERBESTIMMUNG, KOMONENTENTRENNUNG, HAMABSPALTUNG

1.1 CHRYSEMYA PICTA BELLII

1.1.1 Hämoglobingewinnung

Die Blutabnahme erfolgte im Max Planck Institut f. exp. Medizin (Göttingen). Mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschene Erythrozyten wurden von Prof. N. Heisler zur Verfügung gestellt. Die Zellen waren bei -70°C aufbewahrt worden. Zur Lyse wurde mit dem 1,5-fachen Volumen Wasser aufgefüllt, eine Stunde in der Kälte stehen gelassen und bei 12000 Upm zentrifugiert. Der Rückstand aus gequollenem Kern- und Membranmaterial wurde zur Extraktion von anhaftendem Hämoglobin mehrmals mit verdünnter NaCl-Lösung gewaschen. Zur Entfernung von Lipiden wurde die vereinigte Hämoglobinslösung mit 1 ml CCl_4 ausgeschüttelt. Das Lysat wurde 2 h gegen fließendes Wasser dialysiert, ausgefallenes Material durch Zentrifugation bei 16000 Upm für 20 min. abgetrennt.

1.1.2 Titerbestimmung

Der Hämoglobingehalt wurde nach Cannan^[1] bestimmt. Zu 3 ml Trafolösung wurden 15 μl Hämoglobinslösung gegeben. Nach 15 min Stehen bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 540 nm gegen Trafolösung gemessen. Mit einem molaren Extinktionsko-

effizienten des CN-Methämoglobins von 44000 läßt sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Hämoglobinkonzentration berechnen.

Trafolosung: 0,16% Kaliumhexacyanoferrat

0,16% Kaliumcyanid

in dest. Wasser

1.1.3 Komponententrennung

Die Trennung der Hämoglobine erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose (Whatman, CM 52 preswollen). 10 ml der Hämoglobinlösung (80-150 mg Hämoglobin) wurden über Nacht gegen Startpuffer dialysiert und auf die äquilibrierte Säule gepumpt. Nach dem Durchfluß von 50 ml Startpuffer wurde mit einem Salzgradienten eluiert.

Säule: CM 52 Cellulose; 1,6 cm x 12 cm

Startpuffer: 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9

Gradient: linear 100 ml 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9

100 ml 0,10 M Natriumphosphat; pH 6,9

Flußrate: 20 ml/h

Fraktionen: 5 ml/15 min

Durch alle Puffer wurde CO geperlt. Die Arbeiten wurden im Kühlraum bei ca. 4°C durchgeführt. Die Extinktionen der Fraktionen wurden bei 415 nm und 280 nm vermessen. Die vereinigten Gipfelfraktionen wurden mittels Diaphragmafiltration konzentriert.

1.1.4 Hämabspaltung nach Rossi-Fanelli^[2]

Zur Gewinnung des Gesamtglobins wurde die 2%-ige Hämoglobinlösung langsam unter stetigem Rühren in das 20-fache Volumen

auf -18°C gekühltes, salzsaures (10 ml HCl conc./1 l) Aceton getropft. Das Häm bleibt in Lösung, das Globin fällt als flockiger Niederschlag aus. Nach 1-stündigem Ruhen in der Kälte wurde 20 min bei 6000 Upm (gekühlter Rotor) zentrifugiert, das Globin in wenig Wasser aufgenommen, gegen 0,5 N Essigsäure dialysiert und das lyophilisierte Globin bei -20°C gelagert.

1.1.5 Hämabspaltung nach Teale^[3]

Da die bei einer zweiten Aufarbeitung angefallene Hämoglobinlösung sehr verdünnt war wurde das Häm nicht durch salzsaure Acetonfällung entfernt. Eine Konzentrierung der Hämoglobinlösung wurde vermieden, weil Hämoglobine dabei leicht denaturieren.

Das Hämolysat wurde mit Wasser verdünnt, die erhaltene 0,2%-ige Lösung im Eisbad gekühlt, mit 0,5 N HCl auf pH 2 titriert und sofort mit dem doppelten Volumen an kaltem Methylethylketon im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die wässrige Phase enthält das Globin: Sie wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, über Nacht gegen 0,1 N Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

1.2 PHRYNOPS HILARII

1.2.1 Hämoglobingewinnung

Gesamthämolysat wurde von Prof. E. Reischl (Universität Porto Alegre; Brasilien) zur Verfügung gestellt. Das Blut war aus der Halsarterie dekapitierter Tiere in einem hepari-

nisierten Gefäß aufgefangen worden. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte nach der bei *Chrysemys picta bellii* beschriebenen Methode.

Hämoglobinlosung der isolierten Komponente C II wurde ebenfalls zur Verfügung gestellt. Die Trennung der Komponenten war durch Ionenaustausch-Chromatographie des reduzierten Hämoglobins in der CO-Form an DEAE-Sephacel erfolgt (0.02 M Tris/HCl; pH 7.7; linearer NaCl-Gradient)^[4].

1.2.2 Hämabspaltung

Die Abtrennung des Häms erfolgte direkt während der Ketten-trennung am HPLC (siehe 2.2.1)

1.3 IGUANA IGUANA

1.3.1 Blutabnahme

Ein Tier wurde bei einem Händler in München gekauft. Dem narkotisierten Tier wurden aus der Schwanzvene mit einer heparinisierten Spritze 10 ml Blut entnommen. Das Blut wurde 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert, das Serum verworfen, die Erythrozyten dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und bei -70°C aufbewahrt.

1.3.2 Hämolyse

Die Lyse eines Teils der Blutzellen und Gewinnung des Hämolylysats erfolgte wie bei *Chrysemys picta bellii* beschrieben (siehe 1.1.1).

Um Oxidation von SH-Gruppen zu verhindern wurden bei der Ge-

winnung des Hämolysates, das bei der Komponententrennung eingesetzt wurde, nur Lösungen verwendet, die 1 mmol DTE enthielten. Diese Hämoglobinlösungen wurden gegen 0,02 M Tris/HCl (pH 8,5) dialysiert.

1.3.3 Titerbestimmung (siehe 1.1.2)

1.3.4 Komponententrennungen

a) Komponententrennung auf CM 52 Cellulose

Die Hämoglobinlösung wurde bei pH 8,5 (0,02 M Tris/HCl) 5 mmolar an DTE gemacht, 2h auf dem Eisbad reduziert, und gegen Startpuffer dialysiert. Die Probe wurde auf eine mit Startpuffer aquilibrierte Säule gepumpt und nach dem Durchfluß von 30 ml Startpuffer mit einem linearen Salzgradienten bei 4°C eluiert.

Säule: CM 52 Cellulose; 1,6 cm x 12 cm

Startpuffer: 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9; 0,001 M DTE

Gradient: linear 150 ml 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9;
0,001 M DTE
150 ml 0,10 M Natriumphosphat; pH 6,9;
0,001 M DTE

Flußrate: 20 ml/h

Fraktionen: 5 ml/15 min

Die Extinktionen der Fraktionen bei 415 nm und 280 nm wurden gemessen.

b) Komponententrennung an DEAE-Sephacel

Die Hämoglobinlösung wurde wie oben bei pH 8,5 reduziert, gegen Startpuffer dialysiert und auf die mit Startpuffer aquilibrierte Säule gepumpt. Nach Durchfluß von 30 ml Start-

puffer wurde die Chromatographie mit einem linearen NaCl-Gradienten entwickelt.

Säule: DEAE-Sephacel, 1,6 cm x 14 cm

Startpuffer: 0.05 M Tris/HCl; pH 8.4; 0.001 M DTE

Gradient: linear 250 ml Startpuffer
250 ml Startpuffer + 0,15 M NaCl

Flußrate: 20 ml/h

Fraktionen: 5 ml/15 min

Die Trennung wurde bei 4°C durchgeführt. Die Extinktionen der Fraktionen wurden bei 415 nm und 280 nm vermessen. Die Zusammensetzung der Komponenten wurde durch denaturierende Elektrophorese in Gegenwart von Triton X 100 getestet.

1.3.5 Hämabspaltung

Die Abspaltung des Häm erfolgte durch saure Acetonfällung (siehe 1.1.4).

2. KETTENTRENNUNGEN

2.1 CHRYSEMYS PICTA BELLII

2.1.1 a) Kettentrennung an CM 52 Cellulose^[5]

50-100 mg Globin wurden in 10 ml Startpuffer (pH 8.5) gelöst und nach Zugabe von 30-60 mg DTE 4 h unter Stickstoff reduziert. Danach wurde mit 0,1 N HCl auf pH 3,8 titriert die Lösung auf die Säule gepumpt und mit ca. 50 ml Startpuffer

gewaschen. Die Elution erfolgte mit logarithmischen und linearen Gradienten.

Säule: 2,5 cm x 17 cm; CM 52 (Whatman, preswollen)

Startpuffer: 0,025 M Natriumacetat; 8 M Harnstoff;

0,2% Mercaptoethanol; HCl ad pH 4,7

Gradient A: logarithmisch 500 ml Startpuffer

600 ml Startpuffer + 0,175 M NaCl

Gradient B: logarithmisch 400 ml Startpuffer + 0,175 M NaCl

Gradient C: linear Startpuffer + 0,35 M NaCl

Flußrate: 40 ml/h

Fraktionen: 10 ml/15 min

Zur Elution wurden in die vordere geschlossene Kammer des Gradientengefäßes 500 ml Startpuffer vorgelegt, in die hintere offene Kammer wurden 600 ml Startpuffer + 0,175 M NaCl gefüllt. Dieser Gradient blieb angelegt bis α^A - und α^D -Ketten eluiert waren, wobei etwa 100 ml Puffer konstanter Salzkonzentration durch die Säule liefen. Die jetzt leere hintere Kammer wurde mit 400 ml Startpuffer + 0,175 M NaCl gefüllt. Die Elution der β -Ketten wurde mit diesem logarithmischen Gradienten verzögert. Als die hintere Kammer wieder geleert war, wurde sie mit Startpuffer + 0,35 M NaCl auf das Flüssigkeitsniveau der vorderen Kammer gefüllt, die vordere Kammer geöffnet und die β -Ketten mit einem linearen Gradienten eluiert. Die Extinktion des Eluens wurde bei 280 nm mit einem Durchflußphotometer (Isco, UA 5) bestimmt. Die vereinigten Gipfelfraktionen wurden kurz gegen destilliertes Wasser dialysiert, am Rotationsverdampfer eingengt, über Sephadex G-25 entsalzt, erneut eingengt und lyophilisiert. Die Reinheit der Ketten wurde elektrophoretisch kontrolliert.

2.1.1 b) Isolierung von α^D -Ketten mittels HPLC^[6]

Zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie stand ein Gerät der Firma Beckman zur Verfügung (Gradient Liquid Chromatograph Model 334, Controller 421).

Die Trennung der Globinketten der Nebenkompente HbD durch HPLC über RP 2 Säulen wurde im Sauren durchgeführt. Dabei wurde zugleich die Abtrennung des Häms erreicht.

Säule: 8 mm x 25 cm; selbst gepackt mit

LiChrosorb RP2, 7 μ m; (Merck) ✓

Puffer A: 0,1 M Ammoniumacetat; 5 % Ameisensäure

B: Acetonitril

Gradient: 0 min 0 % - 37 % B in 2 min

2 min 37 % - 60 % B in 25 min

Flußrate: 2 ml/min

Bis zu 10 mg Hamoglobin konnten in einem Lauf über eine präparative RP 2 Säule getrennt werden. 0,9 ml Hamoglobinlösung wurden direkt vor der Applikation mit 0,1 ml konz. Ameisensäure angesäuert. Die Extinktion wurde bei 280 nm im Durchflußphotometer (Biotronic BT 3030) gemessen und das Elutionsprofil von einem Schreiber/Integrator (Shimadzu C-R1A) aufgezeichnet. Die protein-haltigen Fraktionen wurden von Hand gesammelt. Die Globinlösungen wurden zur Entfernung des Acetonitrils im Vakuum eingengt und nach Entsalzung über Sephadex G-25 in 0,1 N Essigsäure lyophilisiert.

2.2 PHRYNOPS HILARII

2.2.1 Isolierung der α^D -Ketten

Sowohl aus der Hämoglobinlösung der Komponente C II als auch aus dem Gesamthämolysat ließen sich mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie die α^D -Ketten bei gleichzeitiger Hämabspaltung gewinnen^[6]. Die Hämoglobinlösungen wurden vor der Chromatographie mit DTE bei pH 8,4 für 2 Stunden unter Stickstoff reduziert und direkt vor der Injektion mit Ameisensäure angesäuert.

Die Chromatographie und die Aufarbeitung der Fraktionen erfolgte wie bei den α^D -Ketten von *Chrysemys picta bellii* (2.1.1 b) beschrieben.

2.3 IGUANA IGUANA

2.3.1 Kettentrennung an CM 52 Cellulose^[5]

Die Kettentrennung erfolgte über CM 52 Cellulose in 8 M Harnstoff, Natriumacetatpuffer, pH 5. Die Probenvorbereitung und die Aufarbeitung der Fraktionen geschah wie bei *Chrysemys picta bellii* (2.1.1 a) beschrieben, es wurde jedoch ein höherer pH-Wert und ein anderer Gradientenverlauf gewählt.

Säule: 2,5 cm x 17 cm; CM 52 (Whatman, preswollen)

Startpuffer: 0,02 M Natriumacetat; 8 M Harnstoff;

0,2% Mercaptoethanol; HCl ad pH 5,0

Gradient A: logarithmisch 600 ml Startpuffer

800 ml Startpuffer + 0,13 M NaCl

Gradient B: logarithmisch 500 ml Startpuffer + 0,30 M NaCl

Flußrate: 40 ml/h

Fraktionen: 10 ml/15 min

3. ELEKTROPHORESEN

3.1 Disk-Gelelektrophorese^[7]

Unter nativen Bedingungen wurde die Verteilung der Hämoglobinkomponenten untersucht. Verwendet wurden Rundgele (0,5 cm x 8 cm).

Gelzusammensetzung: 10 % Acrylamid-Bisacrylamid
0,4 M Tris/HCl-Puffer pH 8,9

Elektrophoresepuffer: 0,07 M Tris/Glycin-Puffer pH 8,3

Proben von ca. 25 µg Hämoglobin, beschwert mit Saccharose wurden aufgetragen. Nach 5 minütigem Konzentrieren (1 mA pro Gel) betrug die Laufzeit 2 h bei 4,5 mA pro Gel. Eine Spur Bromphenolblau diente als Frontindikator. Die Banden wurden mit 1 %-iger Amidoschwarz-(10 B)-Lösung in 7 %-iger Essigsäure angefärbt und mit 7 %-iger Essigsäure entfärbt und fixiert.

3.2 Triton-Gelelektrophorese^[8]

Die Elektrophorese von Globinketten wurde unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Rovera durchgeführt, wobei Rundgele (0,5 cm x 8 cm) verwendet wurden.

Gelzusammensetzung: 12 % Acrylamid-Bisacrylamid
8 M Harnstoff
5 % Essigsäure
2 % Triton X-100

Elektrophoresepuffer: 5 % Essigsäure

Probenpuffer: 8 M Harnstoff, 8 % Essigsäure
8 % Mercaptoethanol

Die Vorelektrophorese dauerte 1 Stunde bei 200 V. Ca. 10 µg pro Globinkette, gelöst in 20-50 µl Probenpuffer wurden pro Gel aufgetragen. Die Laufzeit betrug 3 1/2 h bei 140 V. Gefärbt wurde mit 1 % Amidoschwarz (10 B) in 7 %-iger Essigsäure, entfärbt mit 7 %-iger Essigsäure, bei gleichzeitiger Fixierung der Proteinbanden.

3.3 Dünnschicht-Elektrophorese

Mittels Dünnschicht-Elektrophorese wurden peptidhaltige HPLC-Fractionen auf Einheitlichkeit getestet und einige kleine Peptide im präparativen Maßstab (bis 50 nmol) nachgereinigt. TLC-Cellulose-Platten 0,1 mm (Merck) dienten als Trägermaterial. Im analytischen Maßstab wurden bis zu 10 μ l wässrige Lösung (mit 0,5-2 nmol) der Peptide getüpfelt, für präparative Trennungen bis zu 50 μ l (mit bis zu 50 nmol Peptid). Die Proben wurden mit dem Fön getrocknet. Die im Kühlschrank gekühlten Platten wurden gleichmäßig mit Elektrophoresepuffer besprüht und sofort in die horizontale, geschlossene Kammer gelegt. Die vorherige Kühlung erleichtert das Überführen der feuchten Platten, die sonst schnell teilweise abtrocknen.

Platten: DC-Fertigplatten Cellulose, 10 x 20 cm
Schichtdicke 0,1 mm (Merck)

Elektrophoresepuffer: 5 % Pyridin, 5 % Aceton,
Essigsäure ad pH 5,4 in Wasser.

Laufzeit: 1 - 1,5 Stunden

Spannung: 450 Volt (12 - 15 mA)

Das Elektrophoresebett wurde mit fließendem Leitungswasser gekühlt. Nach Trocknung der Platte bei 80°C wurden die Peptide mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Zum Nachweis Histidin- u. Tyrosin-haltiger Peptide wurde die Platte zusätzlich mit diazotierter Sulfanilsäure besprüht.

Bei den präparativen Elektrophoresen wurden nur schmale Bahnen angefärbt. Die peptidtragenden Zonen wurden ausgekratzt und die Peptide mit 0,1 N Essigsäure von der Cellulose eluiert.

4. OXIDATION, REDUKTION, CITRACONYLIERUNG

4.1 Oxidation^[9]

Die Oxidation der Cysteine und Methionine erfolgte mit Ferameisensäure. Ameisensäure und 30%-iges Perhydrol wurden 10:1 gemischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur umgesetzt. 10-30 mg Globinketten wurden in einem Spitzkolben in möglichst wenig (bis 100 µl) kalter Ferameisensäure gelöst und für ca. 15 min im Kaltebad knapp über dem Gefrierpunkt in einem sirupartigen Zustand gehalten. Danach wurde mit kaltem Wasser auf 150 ml verdünnt und sofort lyophilisiert.

4.2 Reduktion

Zur Reduktion der Methionine wurden bis zu 50 mg Globinketten in 5 ml 6 M Guanidin-HCl, 50 mM DTE, pH 8,4 gelöst und 2 Stunden im Stickstoffstrom reduziert. Die Ketten wurden nach Zugabe von 5 ml 8 M Harnstoff über Sephadex G-25 in 0,1 % Ammoniak entsalzt und lyophilisiert.

4.3 Citraconylierung^[10]

Die reversible Blockierung der Aminogruppen erfolgte durch Umsetzung mit Citraconsaureanhydrid. Eine Lösung von 10-50 mg Globinketten in 3 ml 6 M Guanidin-HCl wurde mit einigen Tropfen Triethanolamin auf pH 9,6 titriert. Während der portionsweisen Zugabe von 100-500 mg Citraconsaureanhydrid

(1:1 verdünnt mit Dioxan) wurde der pH-Wert mit 2,5 N NaOH konstant gehalten. Die Reaktionszeit betrug 1 Stunde. Die Lösung wurde nach Zugabe von 3 ml 8 M Harnstoff über Sephadex G-25 in 0,1 % Ammoniak entsalzt und lyophilisiert.

5. ENZYMATISCHE UND CHEMISCHE SPALTUNGEN

5.1 CHRYSEMYS PICTA BELLII, α^A -KETTEN

5.1.1 Tryptische Spaltung^[11]

27 mg (1,6 μ mol) native α^A -Ketten wurden in 2 ml verd. Ammoniaklösung aufgenommen und 2,5 Stunden bei pH 10,5 mit 3 % TPCK-Trypsin bei Raumtemperatur gespalten, das Enzym in zwei Portionen zugegeben. Bei pH 6,4 wurde das "Core" ausgefällt, abzentrifugiert, 2 x mit wenig Wasser gewaschen und bei -70°C aufbewahrt. Die vereinigten Überstände wurden auf pH 3,4 titriert und auf 1,5 ml eingengt. Diese "lösliche Fraktion" wurde über Sephadex G-25 fine in 0,1 N Essigsäure vorfraktioniert.

Säule: Seph. G-25 fine; 2,5 cm x 220 cm

Eluens: 0,1 N Essigsäure

Flußrate: 19 ml/h

Fraktionen: 4,75 ml/15 min

Das Eluat wurde bei 230 nm und 280 nm vermessen. Die Gipfel-fraktionen wurden auf 1 ml eingengt und bis zur Isolierung der Peptide über HPLC bei -20°C aufbewahrt.

5.1.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung^[12]

25 mg native α^A -Ketten wurden in 1,5 ml 70 %-iger Ameisensäure, 6 M Guanidin/HCl 65 Stunden bei 42°C inkubiert. Nach Zusatz von 0,5 ml 8 M Harnstoff wurde das Gemisch über Sephadex G-50 fine in 10 % Ameisensäure, 8 M Harnstoff getrennt.

Säule: Seph. G-50 fine; 2,5cm x 190cm

Eluens: 10 % Ameisensäure, 8 M Harnstoff

Flußrate: 17 ml/h

Fraktionen: 23 min

Das Trennungsprofil wurde bei 280 nm registriert. Das hydrolytische C-terminale Peptid wurde über Sephadex G-25 in 1 N Essigsäure entsalzt und lyophilisiert. Die Reinheitsprüfung erfolgte durch manuellen Edman-Abbau.

5.2 CHRYSEMYS PICTA BELLII, α^D -KETTEN

5.2.1 Tryptische Spaltung

a)Nativ:

Die Spaltung von 18 mg nativen α^D -Ketten und die Vortrennung der Peptide erfolgte analog zu den α^A -Ketten.

b)Oxidiert:

20 mg (nach 4.1) oxidierte α^D -Ketten wurden in einigen Tropfen konz. Ammoniaklösung aufgenommen. Nach Verdünnung mit Wasser auf ca. 1 ml wurde 3 Stunden bei pH 10,5 und 3 Stunden bei pH 8,5 mit insgesamt 10 % TPCK-Trypsin verdaut. 3 % Trypsin wurden zu Beginn der Spaltung zugesetzt, die restliche Menge in Portionen nach jeweils einer Stunde. Nach

jeder Stunde wurde der Verlauf der Spaltung mittels HPLC von Aliquots (10 μ l) des Spaltansatzes verfolgt. Beim Senken des pH auf 6,0 bildete sich ein Niederschlag, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Überstand und Niederschlag wurden bis zur Isolierung der Peptide durch HPLC bei -70°C eingefroren.

5.2.2 Limitiert tryptische Spaltung an den Argininen

10 mg citraconylierte α^{D} -Ketten wurden in 1,5 ml 0,01 N NaOH gelöst und bei pH 11, 10 und 9,6 je eine Stunde bei Raumtemperatur mit insgesamt 5 % TPCK-Trypsin gespalten. Die Trypsinmenge wurde in drei Portionen zugegeben, die Spaltung durch Senken des pH auf 3,0 mit 0,1 N HCl gestoppt. Der Ansatz wurde einrotiert und zur Deblockierung 2 Tage in 3ml 50 %-iger Ameisensäure bei $+6^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen. Die Lösung wurde eingeeengt und lyophilisiert.

5.2.3 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung

15 mg native α^{D} -Ketten wurden wie in 5.1.2 beschrieben gespalten. Auch die Isolierung und Reinheitsprüfung des erzeugten C-terminalen Peptids erfolgte analog.

5.3 CHRYSEMYS PICTA BELLII, β -KETTEN

5.3.1 Tryptische Spaltung

Da die nativen β -Ketten im alkalischen sehr schlecht löslich waren, wurde in Suspension gespalten. Dazu wurden 33 mg β -Ketten in wenig 50 %-iger Ameisensäure gelöst und, nach mehrmaligem Verdünnen mit Wasser und Einengen, mit verd. NaOH auf pH 10,5 titriert. Dabei fielen die Ketten als sehr fein verteilter Niederschlag aus. Spaltung der Ketten und Vortrennung der Peptide erfolgte wie bei 5.1.1.

5.3.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung

Spaltung von 25 mg nativen β -Ketten sowie Isolierung und Reinheitsprüfung des Peptids erfolgten wie unter 5.1.2 beschrieben.

5.4 PHRYNOPS HILARII, α^D -KETTEN

5.4.1 Tryptische Spaltung

7 mg native α^D -Ketten wurden bei Raumtemperatur mit 3 % TPCK-Trypsin jeweils 1 h bei pH 11, bei pH 9,5 und bei pH 8,5 verdaut. Trypsin wurde in 2 Portionen zugegeben. pH-Werte wurden mit verd. Ammoniak und verd. Essigsäure eingestellt. Nach Titration auf pH 6,3 wurde eine geringe Menge an Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Das N-terminale hydrolytische Peptid (aus der Asp-Pro-Spaltung von 10 mg α^D -Ketten) wurde bei Raumtemperatur

mit 5 % TPCK-Trypsin je 1 h bei pH 11 und bei pH 8,5 nachgespalten. Beim Ansäuern auf pH 3,5 fiel kein "core" aus. Die Lösung wurde über Sephadex G-25 fine in 0,1 N Essigsäure vorgetrennt.

Ungetrennte Bromcyan-Peptide wurden bei Raumtemperatur 1 h mit 5 % TPCK-Trypsin bei pH 8,5 nachgespalten. Bei pH 6,3 wurde das "core" ausgefällt, abzentrifugiert und 2 x mit wenig Wasser gewaschen. Es konnte durch Lösen bei pH 3,5 und erneutes Fallen bei pH 5,8 weiter gereinigt werden. (pH-Werte wurden mit verd. Ammoniak und verd. Essigsäure eingestellt.) Endgültige Reinigung erfolgte mittels HPLC an Umkehrphase.

5.4.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung

Nach 5.1.2 wurden 10 mg native Ketten gespalten, die Peptide getrennt und entsalzt.

34 mg nach 4.1 oxidierte Ketten wurden wie in 5.1.2 beschrieben gespalten und die Peptide wie dort getrennt. Das C-terminale hydrolytische Peptid wurde über Biogel P 4 (100-200 mesh) in 10 %-iger Ameisensäure entsalzt.

5.4.3 Spaltung an den Methioninen mit Bromcyan^[13]

45 mg reduzierte und citraconylierte Ketten wurden in 40 ml 70 %-iger Ameisensäure gelöst. Unter Stickstoffatmosphäre wurden 20 mg Bromcyan zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden im Dunkeln wurde überschüssiges Bromcyan durch dreimaliges Abrotieren mit Wasser entfernt. Ein Aliquot von 0,5 mg wurde lyophilisiert. Hiervon wurden im Sequenator 2 Schritte abgebaut um den Erfolg der Spaltung zu überprüfen.

Die Hälfte des Spaltansatzes wurde über Sephadex G-50 fine in 0,1 N Essigsäure vorgetrennt.

Säule: Sephadex G-50 fine, 2,6 x 170 cm

Eluens: 0,1 N Essigsäure

Flußrate: 16 ml/h

Fraktionen: 23 min

Die Gipfelfractionen wurden eingeengt, die Peptide mittels HPLC an Vydac RP 18 Material isoliert.

5.5 IGUANA IGUANA α -KETTEN

5.5.1 Tryptische Spaltung

18 mg oxidierte α -Ketten wurden in 1,5 ml verd. Ammoniak gelöst. Bei pH 10,5 und pH 8,5 wurde bei Raumtemperatur jeweils 3 Stunden mit insgesamt 5 % TPCK-Trypsin (in 5 Portionen zugegeben) gespalten. Beim Absenken des pH auf 4,8 fiel ein Niederschlag aus. Er wurde abzentrifugiert und bis zur Chromatographie bei -70°C aufbewahrt. Die Peptide aus der überstehenden Lösung wurden mittels HPLC an LiChrosorb RP 2 bzw. an Vydac RP 18 Material isoliert.

5.5.2 Spaltung am Methionin mit Bromcyan

15 mg reduzierte Ketten wurden in 10 ml 70 %-iger Ameisensäure gelöst. Nach Zugabe von ca. 1 g Bromcyan und Überleiten von Stickstoff betrug die Reaktionszeit 18 Stunden (im Dunkeln). Überschüssiges Bromcyan wurde durch mehrmaliges Abrotieren mit Wasser entfernt. Die Peptidlösung wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 1 ml 6 M Guanidinium-

chlorid gelöst und nach Zusatz von 1 ml 8 M Harnstofflösung über Sephadex G-50 fine in 0,1 N Essigsäure getrennt.

Der Erfolg der Spaltung war zuvor durch automatischen Edmanabbau (2 Schritte) von einem Aliquot des Peptidgemisches überprüft worden.

5.6 IGUANA IGUANA β -KETTEN

5.6.1 Tryptische Spaltung

15 mg oxidierte β -Ketten wurden wie in 5.3.1 beschrieben in verd. Ammoniak suspendiert und je 2 h bei pH 10,5 sowie bei pH 8,4 mit 5 % TPCK-Trypsin gespalten. Der pH-Wert wurde auf 3,4 gesenkt. Die Hälfte der Peptidlösung wurde direkt für die HPLC auf Vydac RP 18 benutzt. Die andere Hälfte wurde über Sephadex G-25 fine in 0,1 N Essigsäure vorfraktioniert.

6. ISOLIERUNG DER PEPTIDE

6.1 Gelfiltration

Vortrennungen tryptischer Peptide erfolgten durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine in 0,1 N Essigsäure. (Bedingungen siehe Legenden der Abbildungen). Die Peptidgemische wurden in Volumina $\leq$ 2 ml per Hand auf die Säulen

aufgetragen. Die Eluate wurden bei 280 nm im Durchflußphotometer und bei 230 nm in einer Apparatur für diskontinuierliche Extinktionsbestimmungen vermessen.

Isolierung bzw. Vortrennung der Bromcyanpeptide erfolgte durch Gelfiltration über Sephadex G-50 fine in 0,1 N Essigsäure. (Bedingungen siehe Legenden der Abbildungen). Zur Applikation wurden Peptidgemische entweder auf ca. 2 ml eingengt, oder die lyophilisierten Peptide in 1 ml 6 M Guanidiniumchlorid + 1 ml 8 M Harnstofflösung aufgenommen. Eluate wurden bei 280 nm bzw. 230nm vermessen.

Vereinigte Gipfelfraktionen wurden am Rotationsverdampfer auf 1-2 ml eingengt und bei -20°C aufbewahrt.

Die Peptide aus der säurehydrolytischen Spaltung wurden durch Gelfiltration über Sephadex G-50 fine in 8 M Harnstoff / 10 % Ameisensäure isoliert. (Bedingungen siehe Legenden der Abbildungen). Das Applikationsvolumen betrug 2 ml. Eluate wurden bei 280 nm vermessen, peptidhaltige Fraktionen über Sephadex G-25 in 0,1 N bzw. 1 N Essigsäure oder über Biogel P 4 (100-200 mesh) in 10 %iger Ameisensäure entsalzt.

6.2 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)^[14,15]

Apparatur:

HPLC-Gerat: Beckman, Gradient Liquid Chromatograph Model 334, Controller 421.

Photometer: Biotronic BT 3030

Schreiber: Shimadzu C-R1A

Für Peptidtrennungen kamen folgende Umkehrphasen als Säulen-

Füllmaterialien zur Anwendung:

LiChrosorb RP 2, Partikelgröße 7 μm ; Merck

" RP 8, " " "

" RP18, " " "

Vydac RP18

Alle Säulen wurden selbst gepackt mit einem Shandon Packgerät (Fa. Gynkotheke; München).

Säulen: Edelstahl, 45 x 250 mm.

Es wurden ausschließlich flüchtige Puffer verwendet: 0,05 M Ammoniumacetat für LiChrosorb, 0,1 % TFA für Vydac. Als organisches Elutionsmittel diente Acetonitril.

Gradienten von 0 - 65 % Acetonitril wurden angelegt.

Flußraten von 1,0 - 2,5 ml/min wurden benutzt.

Detektion: 230 nm

Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Pro Lauf wurden 5 - 100 nmol Peptide in bis zu 500 μl wässriger Lösung injiziert.

Das Sammeln der Fraktionen erfolgte manuell.

Die Fraktionen wurden im Stickstoffstrom getrocknet, zur Entfernung von Ammoniumacetat oder TFA in ca. 300 μl Wasser, 0,1 N Essigsäure oder 0,1 % Ammoniaklösung (je nach Löslichkeit) aufgenommen und lyophilisiert. Aliquote von ca. 0,5 - 2 nmol wurden für die Dünnschichtelektrophorese benutzt. Ein weiterer Anteil von 2 - 20 nmol wurde für die Aminosäureanalyse hydrolysiert.

6.3 Dünnschichtelektrophorese: (siehe 3.3)

7. ANALYSEN

Zur Bestimmung der Bruttoformeln^[16] von Globinketten und Peptiden standen ein Analysator der Firma Beckman Instruments (Model 121 C) mit angeschlossenem Microprozessor (Digital PDP-8/E, Minicomputer, Digital Equipment Corp., Maynard, Mass.) sowie ein Gerät der Firma Biotronic (Model LC 5000) zur Verfügung.

Substanzmengen von 2 bis 20 nmol wurden mit 5,7 N HCl im Vacuum 20 bzw. 200 Stunden hydrolysiert. Zur Bestimmung von Cystein und Methionin wurden die Proben vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxidiert^[9]. Die Zerstörung von Tryptophan wurde durch Zusatz von Thioglycolsäure verhindert^[17]. Der qualitative Nachweis von Tryptophan in tryptischen Peptiden wurde mittels Farbttest^[18] erbracht: Ca. 1 nmol Peptid wurde aus schwach essigsaurer Lösung auf Cellulosefolie (Polygram Cel 300; Fa. Macherey Nagel) getüpfelt, getrocknet und mit folgender Lösung besprüht:

1 g Dimethylaminobenzaldehyd in 90 ml Aceton + 10 ml konz. Salzsäure.

Tryptophanhaltige Peptide ergeben einen bläulich-roten Fleck.

8. SEQUENZ

Globinketten und Peptide wurden nach Edman-Begg^[19] in Filmtechnik im automatischen Aminosäuresequenator (Beckman, 890 B, 890 C und 890 CII) abgebaut. 30 - 180 nmol Peptid kamen zum Einsatz.

"Quadrol"-Programm^[20] (Kupplungspuffer: 0,25 M Quadrol): Globinketten, mit Reagens IV^[21] modifizierte Lysin-Peptide, das C-terminale Bromcyan-Peptid von *Phrynosoma marmoratus*.

"Propin"-Programm^[22] (Kupplungspuffer: 1,25 M Diethylaminopropin, pH 9,0): Arginin-Peptide, C-terminale hydrolytische Peptide, Bromcyan-Peptide, kleine (bis 4 Aminosäuren) hydrophile sowie große, hydrophobe, mit Reagens I^[23] modifizierte Lysin-Peptide.

Die Konversion erfolgte entweder automatisch im Autokonverter (Sequemat P-6, Fa. Kontron Technik GmbH) mit 3 M TFA bei 60°C oder manuell mit 3 M TFA, 14 min bei 80°C.

Die PTH-Aminosäuren wurden mittels Dunnschichtchromatographie (in drei aufeinander folgenden Systemen) oder mittels HPLC identifiziert.

a)Dunnschichtchromatographie^[20,23]:

Platten: DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F245, 0,25 mm, (Merck)

System I: Propionsäure-tert.-Butylester

System II: 80 % Ethylenchlorid, 20 % Essigsäure

System III: 10 % Essigester, 50 % Methanol, 2 % Essigsäure,
38 % Ethylenchlorid

Ca. 10 nmol PTH in 1-5 µl Essigester wurden getüpfelt.

b) Hochdruckflüssigkeitschromatographie^[24];

System A: Stufengradientenelution mit einem Gerät der Firma Hewlett Packard (1084 B Liquid Chromatograph)

Säule: RP 18, ODS-Hypersil, Shandon; 4,6 x 250 mm

Flußrate: 1,2 ml/min

Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 4,8

B: Acetonitril

Stufengradient: nach 0 min 10 % B

" 1 min 20 % B

" 5 min 45 % B

" 14 min 70 % B

" 19 min 10 % B

Temperatur: 60°C

Detektion: multichromatisches Licht 254 nm gegen 330 nm;

Ser und Thr geben negative Gipfel.

System B: Isokratische Elution^[91]

Säule: wie oben

Puffer: 0,685 ml 0,01 M Natriumacetat pH 5,2

0,315 ml Acetonitril

5,0 ml Dichlorethan

Wasser ad 1000 ml

Flußrate: 1,7 ml/min

Temperatur: 60°C

Detektion: 265 nm

Zur HPLC wurden 1-3 nmol PTH aufgetragen.

III. E R G E B N I S S E

9. CHRYSEMYS PICTA BELLII (Zierschildkröte)

Die Erythrozyten, die Prof. N. Heisler zur Verfügung gestellt hatte, stammten von adulten Tieren aus Wildfängen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Abschnitt (1.1) der Methoden beschrieben.

9.1 TRENNUNG DER KOMPONENTEN

Die meisten Schildkroten besitzen zwei oder mehr Hämoglobinkomponenten, die in unterschiedlichem Maße zur Aggregation neigen^[25,26]. Im Blut der vorliegenden Spezies konnten elektrophoretisch (Abb.1a) und durch Ionenaustauschchromatographie zwei Komponenten nachgewiesen werden (Diagramm 1). Polymerisation wurde nicht beobachtet. Die beiden Komponenten Hb A und Hb D liegen im Verhältnis von ca. 5 : 2 vor. Die Elektrophorese des Hamolysats unter denaturierenden Bedingungen liefert drei Banden. Die β -Ketten wandern als einheitliche Bande am langsamsten, die α^D -Ketten laufen etwa doppelt so weit. Darunter findet man die Bande der α^A -Ketten (Abb. 1b).

Diagramm 1

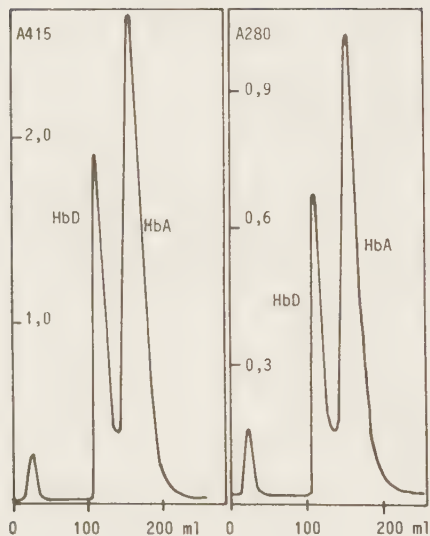
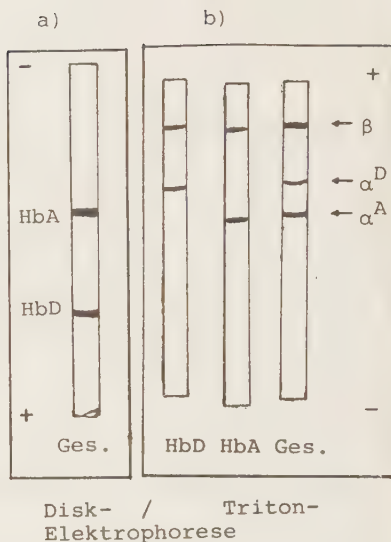


Abb. 1



Komponententrennung an CM 52 Cellulose

Säule: 1,6 x 12 cm

Startpuffer: 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9

Gradient: linear 100 ml 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9
100 ml 0,10 M Natriumphosphat; pH 6,9

Flußrate: 20 ml/h

Fraktionen: 5 ml/15 min

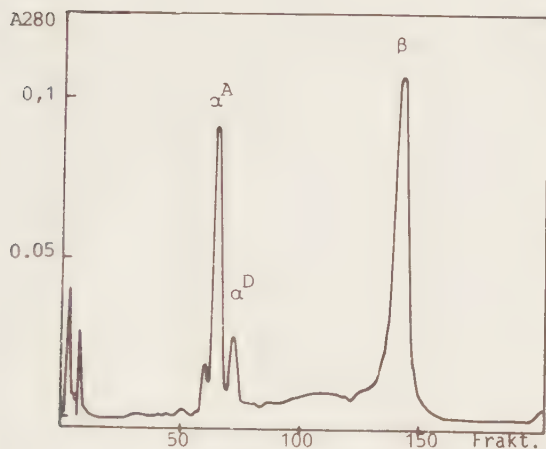
Probe: 80 mg Hämoglobin in 10 ml Startpuffer

9.2 KETTENTRENNUNG

Die Kettentrennung des Globins an Carboxymethylcellulose ist in Diagramm 2 wiedergegeben (Globin nach Rossi & Fanelli oder nach Teale). Die drei Gipfel entsprechen den α^A -, α^D - und β -Ketten. Um eine befriedigende Trennung von α^A - und α^D -Ketten zu erreichen mußte das pH der Probe zum Auftragen unter dem des Startpuffers liegen und der Gradient im Elutionsbereich der α -Ketten sehr flach verlaufen. Für die

Elution der β -Ketten hingegen war ein steiler Gradientenverlauf von Vorteil, da diese sonst als sehr breiter Gipfel eluieren.

Diagramm 2



Kettentrennung an CM 52 Cellulose

Säule: 2,5 x 17 cm

Startpuffer: 0,025 M Natriumacetat; 8 M Harnstoff;
0,2% Mercaptoethanol; HCl ad pH 4,7

Gradient A: logarithmisch 500 ml Startpuffer
600 ml Startpuffer + 0,175 M NaCl

Gradient B: logarithmisch 400 ml Startpuffer + 0,175 M NaCl
Gradient C: linear Startpuffer + 0,35 M NaCl

Flußrate: 40 ml/h

Fraktionen: 10 ml/15 min

Probe: 50 mg Globin in 10 ml Startpuffer pH 3,8

Ausgehend von Gesamtglobin werden auch in der Kettentrennung durch HPLC drei Gipfel, entsprechend den drei Globinketten, erhalten (Diagramm 3).

Diagramm 3

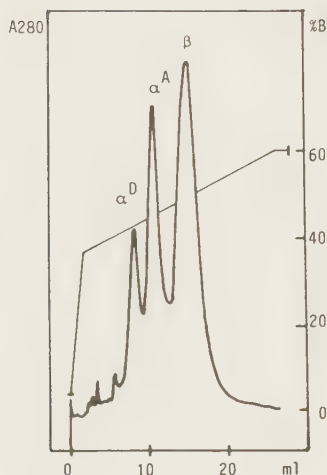
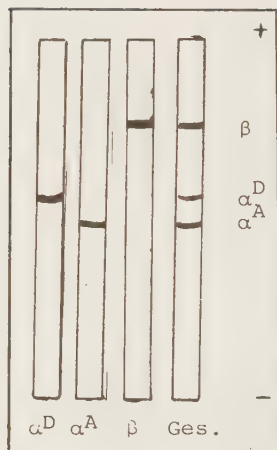


Abb. 2



Kettentrennung mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

Puffer A: 0,1 M Ammoniumacetat, 5% Ameisensäure, pH 2,5

B: Acetonitril

Gradient: 0 - 37% B in 2 min

37 - 60% B in 25 min

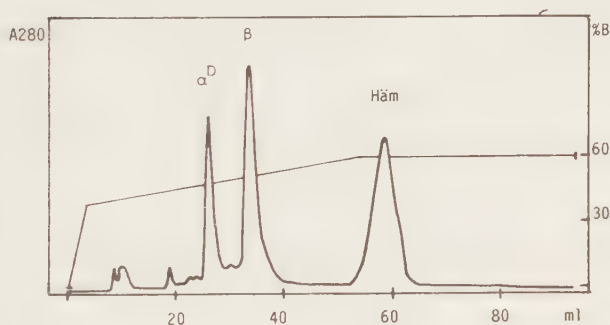
Flußrate: 2 ml/min

Probe: 1 mg Globin

Die Ergebnisse der beiden genannten Trennverfahren und der Komponententrennung bestätigen das Bild der denaturierenden Elektrophorese (Abb. 2). Im Hämoglobin von *Chrysemys picta bellii* werden zwei Komponenten Hb A und Hb D gefunden die sich in den α -Ketten unterscheiden.

Diagramm 4 zeigt die Isolierung von α^D -Ketten, ausgehend von Hb D-Lösung, mit HPLC auf einer präparativen Säule. Hämaspaltung und Trennung, der Ketten erfolgte im gleichen Arbeitsgang. Die Trennung über HPLC war notwendig geworden, da eine neue Charge CM-Cellulose die α -Ketten unter den genannten Bedingungen nicht mehr hinreichend trennte. Die HPLC lieferte sehr reine α^D -Ketten in guten Ausbeuten (ca. 80 %).

Diagramm 4



Isolierung von α^D -Ketten mit HPLC

Säule: 8,0 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

Puffer A: 0,1 M Ammoniumacetat, 5% Ameisensäure, pH 2,5

B: Acetonitril

Gradient: 0 - 37% B in 2 min

37 - 60% B in 25 min

Flußrate: 2 ml/min

Probe: 5 mg HbD in 0,5 ml

9.3 α^A -KETTEN

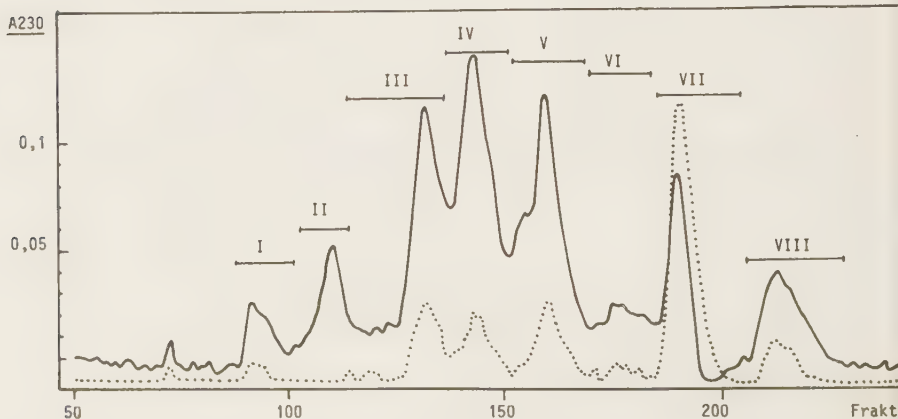
9.3.1 TRYPTISCHE SPALTUNG UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Die α^A -Ketten wurden wie in 5.1.1 der Methoden beschrieben gespalten.

Lösliche Peptide

Der bei pH 6,4 lösliche Anteil wurde auf pH 3,4 titriert und über Sephadex G-25 fine in 0,1 N Essigsäure vorfraktioniert. Der Chromatographieverlauf ist in Diagramm 5 dargestellt.

Diagramm 5



Gelfiltration der löslichen tryptischen Peptide

Säule: 2,5 x 220 cm; Sephadex G-25 fine

Eluens: 0,1 N Essigsäure

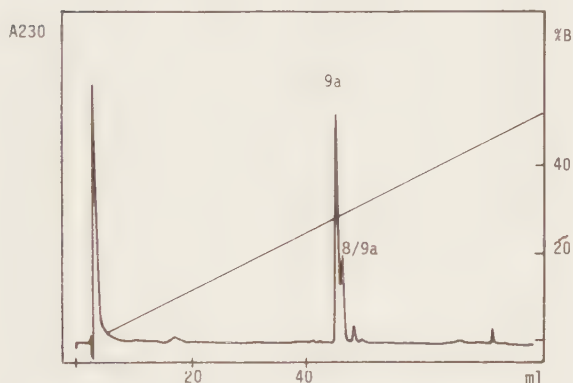
Flußrate: 19 ml/h

Fraktionen: 4,75 ml/15 min

Acht Fraktionen (I-VIII) wurden geschnitten und mit Dünnschichtelektrophorese untersucht.

Die Isolierung der reinen Peptide erfolgte mit HPLC im Ammoniumacetatsystem an RP2 LiChrosorb-Material (Diagramme 6-12).

Diagramm 6



HPLC von Sephadex-Gipfel II

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

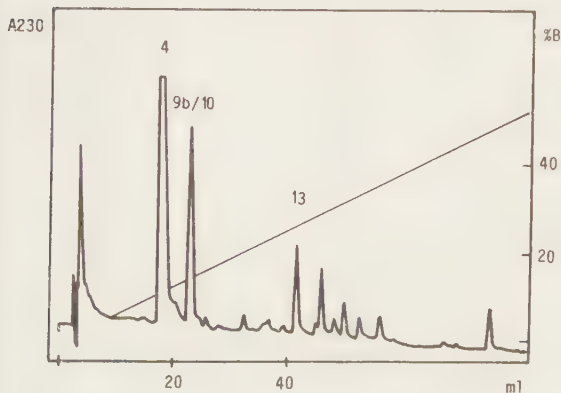
Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0

B: Acetonitril

Gradient: nach 2 min 0 - 40% B in 30 min

Flußrate: 2 ml/min

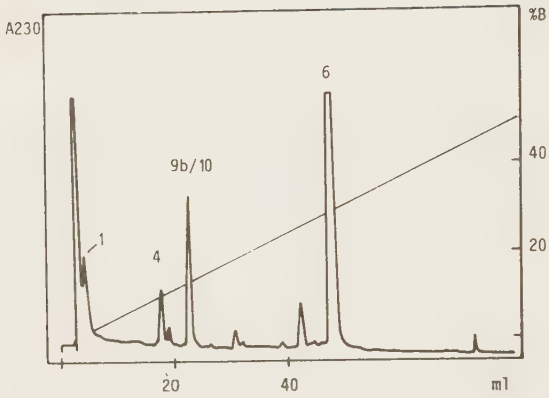
Diagramm 7



HPLC von Sephadex-Gipfel III

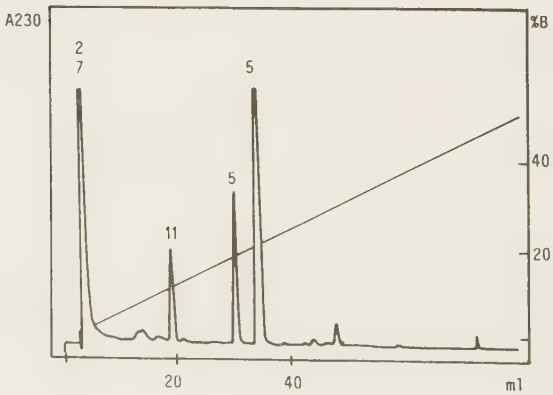
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 8



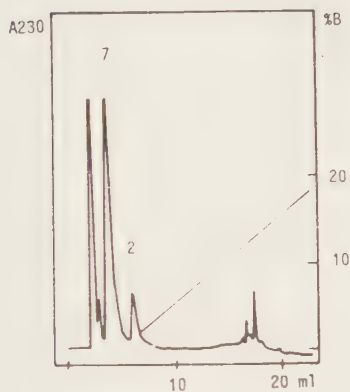
HPLC von Sephadex-Gipfel IV
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 9



HPLC von Sephadex-Gipfel V
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 9a



Trennung von Tp2 und Tp7 mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 8, 7 μ m

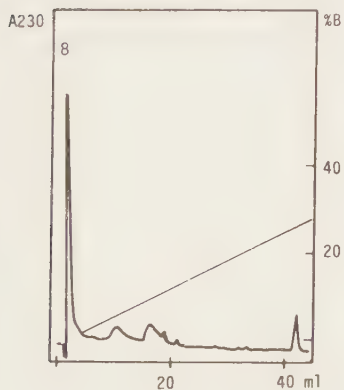
Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0

B: Acetonitril

Gradient: nach 5 min 1% B pro min

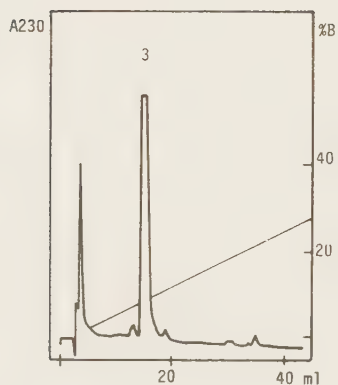
Flußrate: 1 ml/min

Diagramm 10



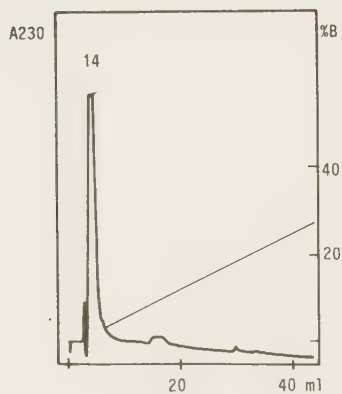
HPLC von Sephadex-Gipfel VI
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 11



HPLC von Sephadex-Gipfel VII
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 12



HPLC von Sephadex-Gipfel VIII
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Alle löslichen Peptide mit Ausnahme von Tp2 und Tp7, die zusammen im Startgipfel eluierten, konnten auf diese Weise rein gewonnen werden. Die Trennung von Tp2 und Tp7 gelang durch Rechromatographie an RP8 LiChrosorb Material (Diagramm 9a). Das Peptid Tp8/9a ist Produkt einer unvollständigen Spaltung am Lysin 61(E10). Es ließ sich für analytische Zwecke von Tp9a abtrennen (Diagramm 6). Zur Sequenzierung wurde das Lyophilisat der Sephadexfraktion II, enthaltend 80 % Tp9a und 20 % Tp8/9a verwendet. Die Aufspaltung von Tp5 (Diagramm 9) in zwei Gipfel ist auf teilweise Oxidation des Methionins zurückzuführen. Beim Arbeiten mit nativem Material zeigten alle Met-Peptide eine solche Aufspaltung. Tp13 wurde in geringen Ausbeuten isoliert.

"Core"-Fraktion:

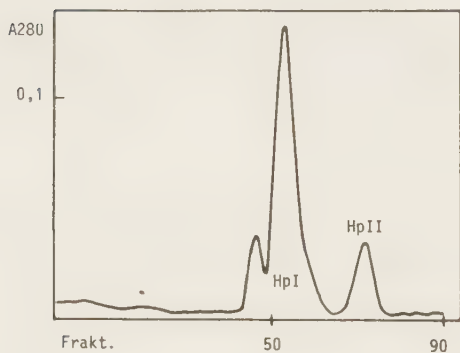
Aus dem bei pH 6,4 gefällten Niederschlag konnte nach Oxidation mit Perameisensäure trotz 4-stündiger tryptischer Nachspaltung (pH 8,7; 10 % Trypsin) nur das ditryptische Peptid Tp12/13 bei pH 6,5 ausgefällt werden.

9.3.2 HYDROLYTISCHE SPALTUNG DER ASP-PRO-BINDUNG UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Die Sequenz von Pos. 100-127 wurde am C-terminalen hydrolytischen Peptid Hp II ermittelt.

Native Ketten wurden wie in Abschnitt 5.1.2 der Methoden beschrieben gespalten. Das Elutionsprofil der Peptidtrennung über Sephadex G-50 ist in Diagramm 13 dargestellt.

Diagramm 13



Gelfiltration des Peptidgemisches aus der säurehydrolytischen Spaltung

Säule: 2,5 x 190 cm; Sephadex G-50 fine

Eluens: 8 M Harnstoff in 10 % iger Ameisensäure

Flußrate: 15 ml/h

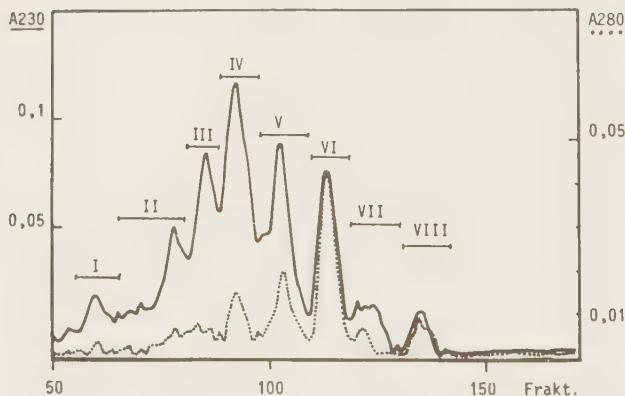
Fraktionen: 5.75 ml/23 min

9.4 α^D -KETTEN

9.4.1 TRYPTISCHE SPALTUNG NATIVER KETTEN UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Die Verdauung mit Trypsin erfolgte wie in Abschnitt 5.2.1 der Methoden beschrieben. Die bei pH 6,5 löslichen Peptide wurden über Sephadex G-25 fine vorgetrennt (Diagramm 14).

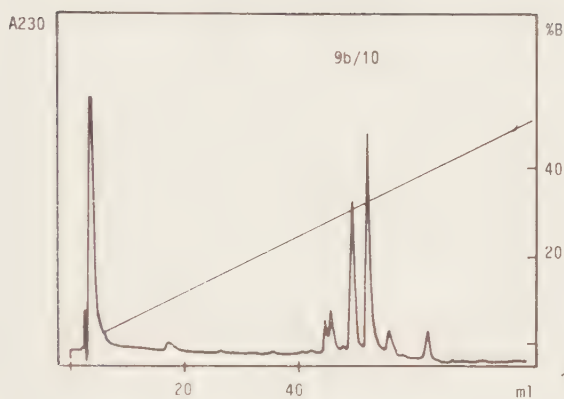
Diagramm 14



Gelfiltration der löslichen tryptischen Peptide
 Säule: 2,5 x 220 cm; Sephadex G-25 fine
 Eluens: 0,1 N Essigsäure
 Flußrate: 22 ml/h
 Fraktionen: 8,4 ml/15 min

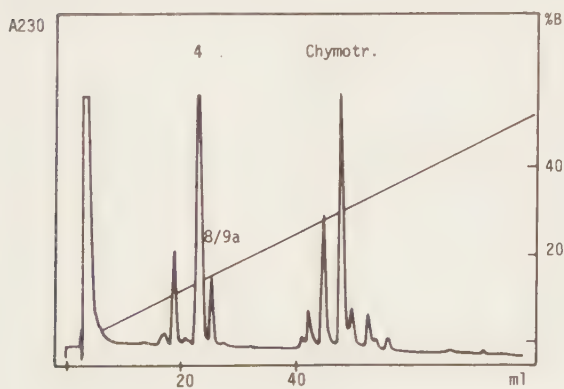
Aus den Fraktionen (II-VIII) wurden mit HPLC an RP2 LiChro-sorb die Peptide isoliert (Diagramme 15-21).

Diagramm 15



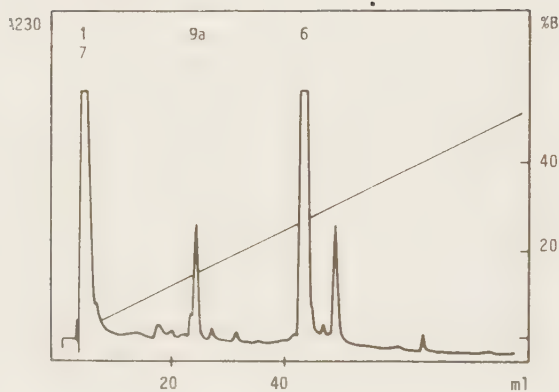
HPLC von Sephadex-Gipfel II
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 16



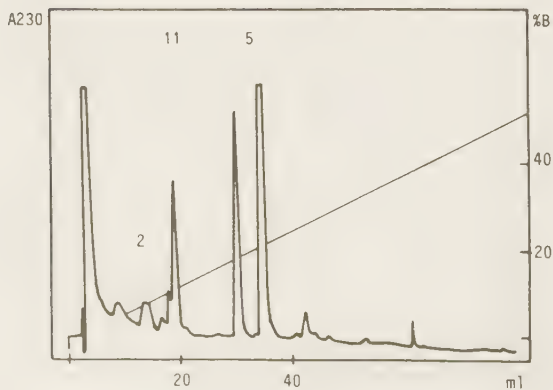
HPLC von Sephadex-Gipfel III
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 17



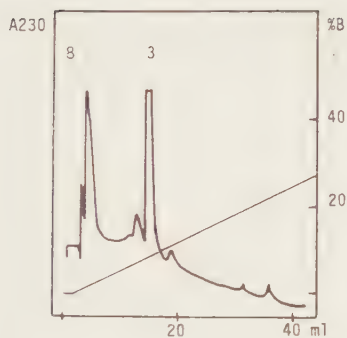
HPLC von Sephadex-Gipfel IV
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 18



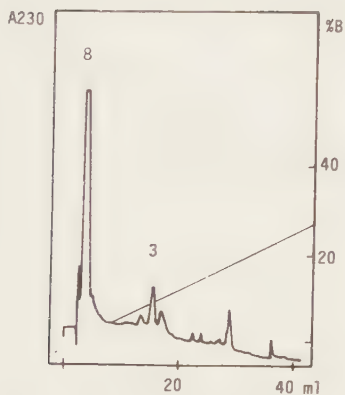
HPLC von Sephadex-Gipfel V
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 19



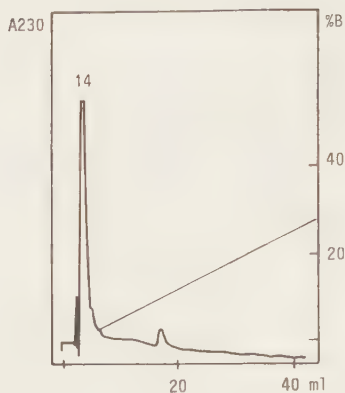
HPLC von Sephadex-Gipfel VI
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Diagramm 20



HPLC von Sephadex-Gipfel VII
Bedingungen wie bei Diagramm 6

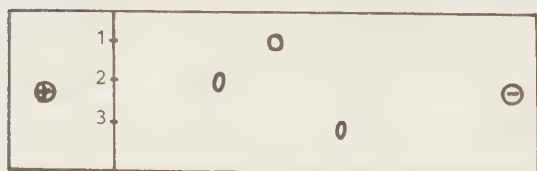
Diagramm 21



HPLC von Sephadex-Gipfel VIII
Bedingungen wie bei Diagramm 6

Bis auf Tp12 und Tp13 wurden alle Peptide gefunden. Auch hier ist eine Aufspaltung der Met-Peptide Tp5 und Tp9b/10 in zwei Gipfel zu beobachten. Tp2 eluiert ebenfalls in zwei Gipfeln, was auf teilweise Zyklisierung des N-terminalen Gln zurückzuführen sein dürfte. Damit im Einklang steht die unterschiedliche Mobilität der beiden Fraktionen in der Dünnschichtelektrophorese bei pH 5.4 sowie die schlechtere Farbreaktion der dabei kürzer laufenden Fraktion mit Ninhydrin (Abb. 3).

Abb. 3



Dünnschichtelektrophorese der beiden Fraktionen von Tp2:
Bahnen 1 u. 2: Tp2; Bahn 3: Lys (Referenz).

Tp12 und Tp13:

Die Bindung Lys-Phe Pos. 127-128 im "core"-Bereich läßt sich mit Trypsin nur sehr schlecht und oft mit geringen Ausbeuten spalten. Aus obiger Spaltung konnten die Peptide Tp12 und Tp13 nicht isoliert werden. Der Versuch die fragliche Sequenz am hydrolytischen Peptid Hp II Pos. 95-141 aufzuklären blieb unbefriedigend. Die Reste in 130, 133, 136 und 137 ließen sich nicht eindeutig bestimmen; Es war also erforderlich Tp13 zu isolieren und zu sequenzieren.

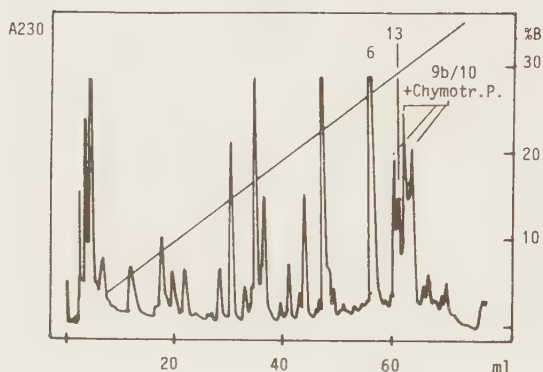
Weder die tryptische Nachspaltung des mit Perameisensäure oxidierten "core"-Materials noch die des C-terminalen

Peptids aus der limitierten tryptischen Argininspaltung (TpArg V Pos. 93-141) war erfolgreich. Bei letzterer konnten jedoch Tp11 und Tp14 in guten Ausbeuten erhalten werden.

9.4.2 TRYPTISCHE SPALTUNG OXIDIERTER KETTEN UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Tp12 und Tp13 konnten erst gewonnen werden, wenn zur tryptischen Spaltung oxidierte Ketten (nach 4.1 der Methoden) verwendet wurden und lange (hier 3 h) bei pH 10,5 verdaut wurde (Bedingungen: Methoden 5.2.1). Der bei pH 6,5 lösliche Teil wurde direkt mit HPLC auf RP2 LiChrosorb weiter analysiert. Nur auf einer frisch gepackten Säule war die Abtrennung des Tp13 von den Peptiden Tp6, Tp9b/10 und dem chymotryptischen Peptid Pos. 72-89 möglich (Diagramm 22). Tp12 wurde aus dem Niederschlag isoliert: Der bei pH 6,5 ausgefällte Niederschlag wurde in 0,1 N Ammoniak aufgenommen und an RP2 LiChrosorb im Ammoniumacetatsystem chromatographiert (Diagramm 23). Tp12 wurde mit dem Acetonitril-Gradienten eluiert obwohl das Präzipitat im verwendeten Ammoniumacetatpuffer nicht löslich war.

Diagramm 22



Isolierung von Tp 13 aus dem tryptischen Gesamthydrolysat
oxidierter Ketten ("core" gefällt) mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

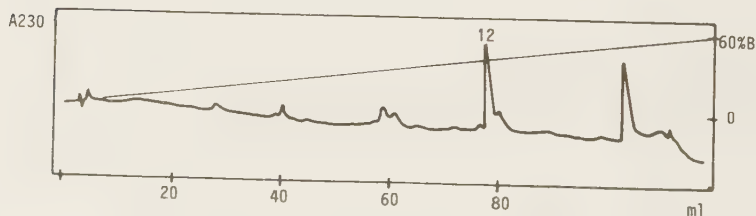
Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat

B: Acetonitril

Gradient: nach 2 min 0 - 60% B in 60 min

Flußrate: 2 ml/min

Diagramm 23

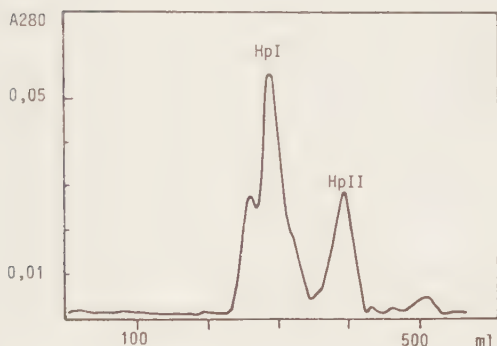


Isolierung des "core"-Peptids Tp 12 mit HPLC
Bedingungen wie bei Diagramm 22.

9.4.3 SAUREHYDROLYTISCHE SPALTUNG DER ASP-PRO-BINDUNG

Die Sequenz des "core"-Bereichs (Pos. 101-126) wurde am C-terminalen hydrolytischen Peptid Hp II ermittelt. Das Peptid wurde gemäß Abschnitt 5.2.3 der Methoden gewonnen. Diagramm 24 zeigt die Trennung des Spaltgemisches über Sephadex G-50 mit 8 M Harnstoff in 10 %iger Ameisensäure.

Diagramm 24



Trennung der Spaltprodukte aus der Säurehydrolytischen Spaltung

Säule: 2,5 x 190 cm; Sephadex G-50 fine

Eluens: 8 M Harnstoff in 10 % iger Ameisensäure

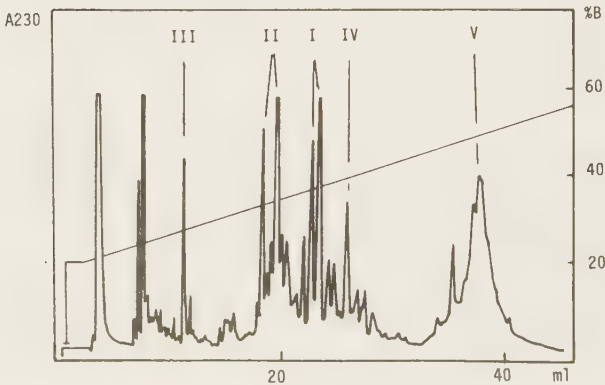
Flußrate: 16 ml/h

Fraktionen: 6,1 ml/23 min

9.4.4 LIMITIERTE TRYPTISCHE SPALTUNG AN DEN ARGININEN

Das Peptid Tp7 ließ sich im Sequenator nicht eindeutig sequenzieren. Um die Sequenz von Pos. 57-61 zu sichern wurden vom Arginylpeptid Tp-Arg III (Pos. 57-71) zehn Schritte im Sequenator abgebaut. Die Citraconylierung der Lysine sowie Spaltung und Deblockierung sind in den Abschnitten 4.3 und 5.2.2 der Methoden beschrieben. Die Trennung der Peptide gelang aus dem Gesamtgemisch durch HPLC am weitporigen Vydac RP18 Material mit 0,1 % TFA als wässriger Phase und linearem Acetonitril-Gradienten. Alle Arginylpeptide konnten mit diesem einstufigen Trennverfahren isoliert werden (Diagramm 25).

Diagramm 25



Trennung der tryptischen Arginylpeptide mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; Vydac RP 18

Puffer A: 0,1 % TFA

B: Acetonitril

Gradient: nach 0,5 min 20% B

nach 2 min 20 - 60% B in 50 min

Flußrate: 1 ml/min

Römische Ziffern entsprechen der Nummerierung der Peptide.

CHRYSEMYS PICTA BELLII

Sequenzierschema der α^D -Ketten

HACP2	5	10	15	20	25	30
	M L N H D E K Q L I K H A W E K V L G H Q E D F G A E A L E					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4		

HACP2	35	40	45	50	55	60
	R M P A V Y P Q T K T Y P P H F D L H H D S E Q I R H H G K					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	Tp5	Tp6				Tp7
	→ → → → →					→ ? ? ? ?
						TpArgIII
						→ → → →

HACP2	65	70	75	80	85	90
	K V V T A L G D A V R H M D N L S E A L S E L S N L H A Y N					
	Tp8Tp9a	Tp9b/10				
	→ → → → →					
	→ → → → →					

HACP2	95	100	105	110	115	120
	L R V D P V N F K L L S H C P Q V V L A V H L A D E Y T P Q					
	Tp11	Tp12				
	→ → → → →					
	HpII					
	→ → → → →					

HACP2	125	130	135	140		
	V H V A Y D K F L A A V S A V L A E K Y R					
		Tp13		Tp14		
	→ → → → →					
	→ → → → →					

9.5 β -KETTEN

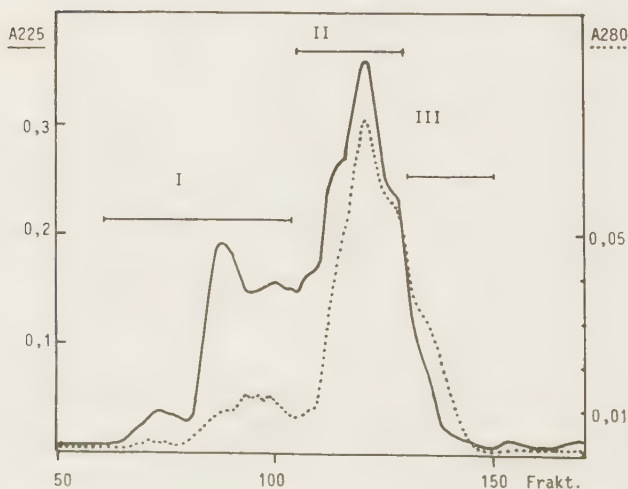
9.5.1 TRYPTISCHE SPALTUNG UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Die nativen β -Ketten waren im alkalischen schlecht löslich. Die Spaltung erfolgte deshalb in Suspension (siehe Abschnitt 5.3.1 Methoden). Im Verlauf der Reaktion entstand eine klare Lösung. Beim Absenken des pH-Wertes auf 6,4 trübte sich die Lösung leicht. Eine kleine Menge Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt.

Die löslichen Peptide:

Der bei pH 6,4 lösliche Anteil wurde auf pH 3,4 titriert und durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine in 0,1 N Essigsäure vorgetrennt (Diagramm 26).

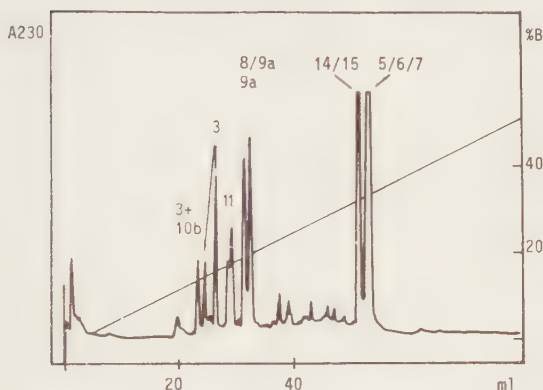
Diagramm 26



Gelfiltration der bei pH 6,4 löslichen tryptischen Peptide
 Säule: 2,5 x 110 cm; Sephadex G-25 fine
 Eluens: 0,1 N Essigsäure
 Flußrate: 10 ml/h
 Fraktionen: 3,3 ml/20 min

Das Eluat wurde in drei Fraktionen (I-III) unterteilt, die mit HPLC im Ammoniumacetatsystem an RP2 LiChrosorb weiter untersucht wurden. Die Resultate der Hochdruckflüssigkeitschromatographie sind in den Diagrammen 27-29 wiedergegeben.

Diagramm 27



Trennung der tryptischen Peptide aus Sephadexgipfel I mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

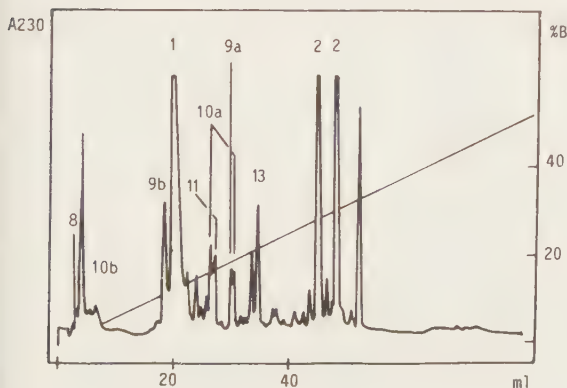
Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0

B: Acetonitril

Gradient: nach 2 min 0 - 40% B in 30 min

Flußrate: 2 ml/min

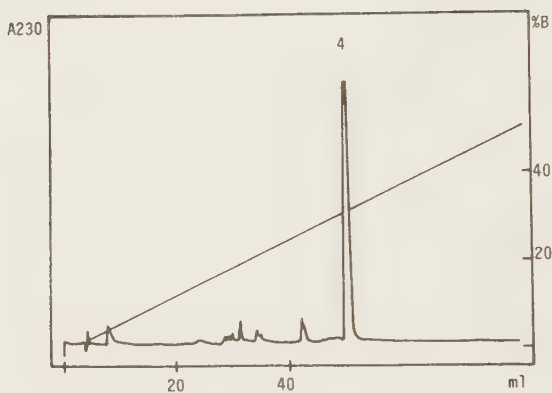
Diagramm 28



HPLC von Sephadex-Gipfel II

Die Bedingungen sind die gleichen wie bei Diagramm 27

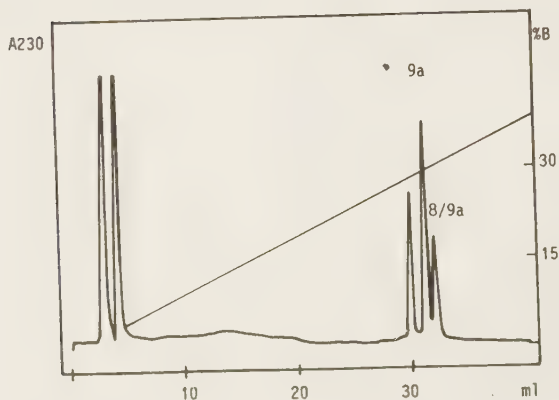
Diagramm 29



HPLC von Sephadex-Gipfel III

Die Bedingungen entsprechen denen bei Diagramm 27

Diagramm 27a



Rechromatographie von Tp8/9a und Tp9a an einer RP 8 Säule

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 8; 7 μ m

Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0

B: Acetonitril

Gradient: nach 5 min 0 - 60% B in 60 min

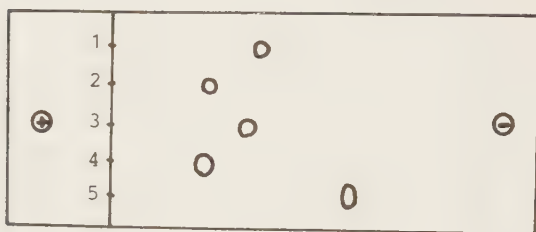
Flußrate: 2 ml/min

Aus der Sephadexfraktion I wurden Tp3, Tp5/6/7, Tp11 und Tp14/15 rein und Tp9a zu ca. 25 % verunreinigt mit dem di-tryptischen Peptid Tp8/9a isoliert. Eine Trennung der beiden letztgenannten Peptide für die Analyse gelang durch Rechromatographie an RP8 LiChrosorb (Diagramm 27a). Tp11 sowie ein kleiner Teil von Tp9a wurden auch in der Sephadexfraktion II gefunden. Aus dieser Fraktion wurden weiters Tp1, Tp2, Tp8, Tp9b, Tp10a und Tp10b sowie Tp13 rein isoliert. Sephadexfraktion III enthielt ausschließlich Tp4. Die Cys-Peptide Tp3 und Tp13 eluierten bei schlechten Ausbeuten in zwei Gipfeln. Teilweise Oxidation der Cysteine oder im Falle von Tp13 des Tryptophans dürfte für diese Aufspaltung verantwortlich sein.

Die Peptide Tp10a und Tp2 eluieren ebenfalls in je zwei getrennten Gipfeln, mit jeweils identischer Bruttoformel. Die polareren Fraktionen mit der jeweils kürzeren Retentionszeit in der HPLC zeigen aber in der Dünnschichtelektrophorese bei pH 5,4 eine erhöhte Mobilität und ergeben eine stärkere Farbreaktion mit Ninhydrin (Abb. 4). Nur die polarere Fraktion von Tp10a konnte im Sequenator abgebaut werden. Die genannten Eigenschaften können durch teilweise Zyklisierung des N-terminalen Glutamins zur Pyroglutaminsäure hervorgerufen werden.

Das Peptid Tp12 wurde nicht isoliert. Seine Sequenz geht jedoch aus der des hydrolytischen Peptids Hp II eindeutig hervor.

Abb. 4

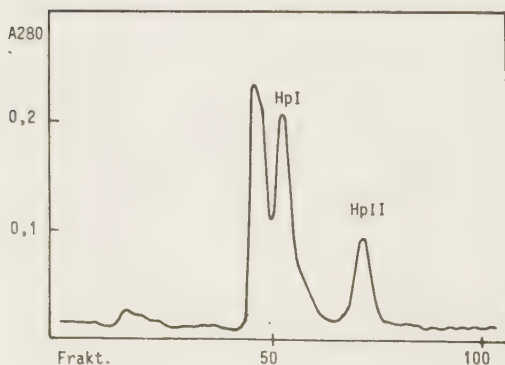


Dünnschichtelektrophorese der je zwei Fraktionen von Tp2 und Tp10a: Bahnen 1 u. 2: Tp10a; Bahnen 3 u. 4: Tp2; Bahn 5: Lys (Referenz).

9.5.2 SAÜREHYDROLYTISCHE SPALTUNG DER ASP-PRO-BINDUNG

Die Spaltungsbedingungen sind in Abschnitt 5.3.2 der Methoden aufgeführt. Diagramm 30 zeigt die Trennung der Peptide durch Gelfiltration über Sephadex G-50.

Diagramm 30



Gelfiltration der Spaltprodukte aus der säurehydrolytischen Spaltung

Säule: 2,5 x 190 cm; Sephadex G-50 fine
 Eluens: 8 M Harnstoff in 10 % iger Ameisensäure
 Flußrate: 17 ml/h
 Fraktionen: 6,5 ml/23 min

CHRYSEMYS PICTA BELLII

Sequenzierschema der β -Ketten

HBCP	5	10	15	20	25	30
	V H W T A D E K Q L I T S L W G K V M V E E C G S E A L A R					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBCP	35	40	45	50	55	60
	L L I V Y P W T Q R P P S T P G M L S N A E A I L H N P H V					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBCP	65	70	75	80	85	90
	H A H G K K V L T S F G E A V K N L D H I K N T F A T L S K					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBCP	95	100	105	110	115	120
	L H C E K L H V D P E N F K L L G N V L I I V L A S H P T K					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBCP	125	130	135	140	145	
	E P T P A C Q A A W Q K L V S A V A H A L A L G Y H					
	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →	→ → → → →
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tab. 1. *Chrysomys picta bellii*; α -Ketten
a) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide:

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60
Asx	2.04 (2)	1.02 (1)	1.01 (1)			1.03 (1)	
Thr				0.98 (1)	1.95 (2)	0.99 (1)	1.01 (1)
Ser						0.98 (1)	
Glx				4.30 (4)	1.03 (1)	1.05 (1)	
Pro					1.07 (1)	1.05 (1)	
Gly	1.08 (1)			1.17 (1)		0.98 (1)	0.98 (1)
Ala	1.06 (1)	1.02 (1)	1.01 (1)	3.36 (3)		1.04 (1)	
Val	0.87 (1)	0.97 (1)	1.01 (1)	2.13 (2)	1.06 (1)		
Met					0.87 (1)		
Ile						0.89 (1)	
Leu	0.89 (1)			1.13 (1)		1.10 (1)	
Tyr				0.99 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	
Phe					1.04 (1)	2.05 (2)	
Lys	0.99 (1)	0.99 (1)	0.96 (1)		0.99 (1)		1.01 (1)
His				1.00 (1)		2.99 (3)	1.00 (1)
Arg				1.03 (1)		0.86 (1)	
Cys							
Trp			(1) (1)				
Sum	7	4	5	15	9	16	4

Pos.	Tp8 61	Tp9a 62-82	Tp9b/10 83-92	Tp11 93-99	Tp12/13(*) 100-139	Tp13 128-139	Tp14 140-141
Asx		2.97 (3)	1.08 (1)	1.97 (2)	2.60 (2)		
Thr		0.87 (1)	0.98 (1)		2.48 (3)	1.78 (2)	
Ser		1.94 (2)	0.97 (1)		3.08 (4)	2.00 (2)	
Glx		1.01 (1)	1.20 (1)		2.36 (2)		
Pro				1.08 (1)	2.23 (2)		
Gly		1.01 (1)			1.01 (1)	1.18 (1)	
Ala		3.93 (4)	1.15 (1)		2.24 (2)	1.11 (1)	
Val		2.01 (2)		2.00 (2)	4.96 (8)	1.95 (2)	
Met							
Ile		0.98 (1)	0.70 (1)		0.95 (1)		
Leu		4.15 (4)	2.08 (2)		5.21 (6)	2.02 (2)	
Tyr							0.85 (1)
Phe				1.00 (1)	2.91 (3)	1.00 (1)	
Lys	1.00 (1)	1.07 (1)		0.96 (1)	2.00 (2)	0.97 (1)	
His		1.06 (1)	0.83 (1)		3.13 (3)		
Arg			1.02 (1)				1.15 (1)
Cys					1.03 (1)		
Trp							
Sum	1	21	10	7	40	12	2

(*) In Tp12/13 liegen Val-Val-Bindungen vor, die bei der
20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten wurden.
Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 1. *Chrysemys picta bellii*: α^A -Ketten

b) Aminosäureanalysen des ditryptischen Peptids Tp8/9a, des Peptids aus der hydrolytischen Spaltung (HpII) sowie der intakten α^A -Ketten:

Pos.	Tp8/9a 61-82	HpII 95-141	Globin 1-141
Asx	3.06 (3)	3.25 (3)	13.33 (13)
Thr	0.98 (1)	2.74 (3)	9.20 (10)
Ser	1.97 (2)	3.25 (4)	7.54 (8)
Glx	1.08 (1)	2.41 (2)	10.52 (10)
Pro		2.64 (3)	4.55 (5)
Gly	1.08 (1)	1.27 (1)	6.44 (6)
Ala	3.88 (4)	2.70 (2)	13.47 (14)
Val	2.01 (2)	6.94 (9)	17.13 (18)
Met			1.11 (1)
Ile	0.94 (1)	0.82 (1)	3.51 (4)
Leu	4.02 (4)	5.68 (6)	14.95 (15)
Tyr		1.10 (1)	4.00 (4)
Phe		3.40 (4)	6.79 (7)
Lys	1.88 (2)	2.99 (3)	10.96 (10)
His	1.10 (1)	2.66 (3)	10.27 (10)
Arg		1.15 (1)	4.55 (4)
Cys		(1) (1)	1.33 (1)
Trp			0.65 (1)
Sum	22	47	141

(*) In HpII liegen Val-Val-Bindungen vor, die bei der 20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten wurden. Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 2. *Chrysemys picta bellii*: α^D -Ketten
a) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide:

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60
Asx	2.09 (2)			1.01 (1)		1.99 (2)	
Thr					1.21 (1)	0.76 (1)	
Ser						1.13 (1)	
Glx	1.00 (1)	1.04 (1)	1.06 (1)	3.70 (4)	1.03 (1)	2.10 (2)	
Pro					1.05 (1)	0.95 (1)	
Gly				1.91 (2)			1.07 (1)
Ala			1.04 (1)	2.27 (2)	0.95 (1)		
Val				1.27 (1)	0.98 (1)		
Met	0.56 (1)				0.90 (1)		
Ile		0.95 (1)				0.94 (1)	
Leu	1.02 (1)	1.05 (1)		2.03 (2)		1.29 (1)	
Tyr					0.93 (1)	0.89 (1)	
Phe				0.83 (1)	0.96 (1)	2.02 (2)	
Lys	0.91 (1)	0.95 (1)	0.93 (1)		0.99 (1)		0.98 (1)
His	0.98 (1)		0.98 (1)	0.91 (1)		3.01 (3)	1.95 (2)
Arg				1.07 (1)		0.92 (1)	
Cys							
Trp			(1) (1)				
Sum	7	4	5	15	9	16	4

Pos.	Tp8 61	Tp9a(*) 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12(*) 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141
Asx		0.95 (1)	4.21 (4)	2.00 (2)	2.35 (2)		
Thr		1.01 (1)			1.05 (1)		
Ser			2.69 (3)		1.21 (1)	1.08 (1)	
Glx			2.16 (2)		3.07 (3)	1.06 (1)	
Pro				0.98 (1)	1.17 (1)		
Gly		1.09 (1)					
Ala		2.00 (2)	2.26 (2)		2.89 (3)	3.68 (4)	
Val		1.98 (3)		1.91 (2)	3.74 (5)	1.77 (2)	
Met			0.63 (1)				
Ile							
Leu		1.17 (1)	5.33 (5)		3.77 (4)	2.38 (2)	
Tyr			0.87 (1)		1.79 (2)		0.95 (1)
Phe				0.97 (1)	0.96 (1)	0.98 (1)	
Lys	1.00 (1)			1.14 (1)	1.07 (1)	1.06 (1)	
His			2.08 (2)		2.61 (3)		
Arg		0.80 (1)	0.78 (1)				1.05 (1)
Cys					1.23 (1)		
Trp							
Sum	1	10	21	7	28	12	2

(*) In Tp9a und Tp12 liegt je eine Val-Val-Bindung vor, die bei der 20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten wurden.

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 2. *Chrysemys picta bellii*; α^D -Ketten
 b) Aminosäureanalysen der Peptide aus der limitiert tryptischen Spaltung (TpArg 3, TpArg 5), der hydrolytischen Spaltung (HpII) sowie der intakten α^D -Ketten:

Pos.	TpArg 3 57-71	TpArg 5 93-141	HpII 95-141	Globin 1-141
Asx	1.09 (1)	3.97 (4)	3.13 (3)	14.28 (14)
Thr	1.30 (1)	1.36 (1)	1.23 (1)	3.83 (4)
Ser		2.07 (2)	2.25 (2)	5.29 (6)
Glx		4.02 (4)	4.26 (4)	15.44 (16)
Pro		2.02 (2)	1.85 (2)	4.43 (4)
Gly	1.89 (2)		1.18 (0)	3.96 (4)
Ala	2.02 (2)	6.40 (7)	5.80 (7)	15.25 (15)
Val	2.66 (3)	7.38 (9)	5.35 (8)	13.90 (14)
Met				2.31 (3)
Ile				2.10 (2)
Leu	1.09 (1)	6.78 (6)	5.43 (6)	17.13 (17)
Tyr		2.38 (3)	2.00 (3)	5.33 (6)
Phe		3.22 (3)	2.73 (3)	6.47 (7)
Lys	1.99 (2)	3.20 (3)	3.49 (3)	9.49 (9)
His	2.09 (2)	3.32 (3)	3.57 (3)	12.52 (13)
Arg	0.88 (1)	0.88 (1)	1.12 (1)	4.42 (5)
Cys		(1) (1)	(1) (1)	1.33 (1)
Trp				1.28 (1)
Sum	15	49	47	141

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 3. *Chrysomys picta bellii*: β -Ketten
a) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide:

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5/6/7 41-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	1.13 (1)		1.02 (1)		3.16 (3)		
Thr	1.08 (1)	0.95 (1)		1.02 (1)	0.99 (1)		1.06 (1)
Ser		1.05 (1)	1.03 (1)		2.25 (2)		0.92 (1)
Glx	1.08 (1)	1.08 (1)	2.96 (3)	1.34 (1)	1.09 (1)		1.13 (1)
Pro				1.00 (1)	1.03 (1)		
Gly		1.04 (1)	1.02 (1)		2.06 (2)		0.95 (1)
Ala	0.96 (1)		1.99 (2)		2.87 (3)		1.09 (1)
Val	0.89 (1)		1.94 (2)	0.77 (1)	0.97 (1)		1.71 (2)
Met							
Ile		0.95 (1)		0.67 (1)	0.97 (1)		
Leu		1.97 (2)	1.03 (1)	2.12 (2)	2.08 (2)		1.04 (1)
Tyr				0.96 (1)			
Phe					2.83 (3)		1.03 (1)
Lys	0.95 (1)	0.93 (1)			0.95 (1)	1.00 (1)	1.08 (1)
His	0.93 (1)				3.78 (4)		
Arg			1.01 (1)	1.13 (1)			
Cys			(1) (1)				
Trp	(1) (1)	(1) (1)		(1) (1)			
Sum	8	9	13	10	25	1	10

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-90	Tp10b 91-95	Tp11 96-104	Tp13 121-132	Tp14/15 133-146
Asx	1.93 (2)			1.80 (2)		
Thr		1.86 (2)			1.39 (1)	
Ser		1.06 (1)				1.11 (1)
Glx		1.15 (1)	1.01 (1)	1.13 (1)	2.92 (3)	
Pro				0.89 (1)	0.99 (1)	
Gly						1.12 (1)
Ala		1.01 (1)			2.76 (3)	3.83 (4)
Val				0.96 (1)		2.02 (2)
Met						
Ile	0.95 (1)					
Leu	1.03 (1)	1.05 (1)	0.98 (1)	1.05 (1)		3.07 (3)
Tyr						0.78 (1)
Phe		0.92 (1)		1.06 (1)	0.95 (1)	
Lys	1.03 (1)	0.96 (1)	0.95 (1)	1.07 (1)	1.03 (1)	
His	1.08 (1)		1.07 (1)	1.06 (1)		2.08 (2)
Arg						
Cys			(1) (1)		(1) (1)	
Trp					(1) (1)	
Sum	6	8	5	9	12	14

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 3. *Chrysemys picta bellii*; β -Ketten

b) Aminosäureanalysen des ditryptischen Peptids Tp8/9a, des Peptids aus der hydrolytischen Spaltung (HpII) sowie der intakten β -Ketten:

Pos.	Tp8/9a 66-76	HpII (*) 100-146	Globin 1-146
Asx		2.44 (2)	10.10 (11)
Thr	0.98 (1)	2.15 (2)	8.91 (9)
Ser	0.91 (1)	2.28 (2)	9.12 (8)
Glx	1.06 (1)	4.16 (4)	14.29 (13)
Pro		1.89 (2)	3.69 (4)
Gly	1.06 (1)	2.07 (2)	7.49 (7)
Ala	1.03 (1)	7.54 (8)	15.99 (16)
Val	1.89 (2)	4.40 (4)	12.28 (12)
Met			
Ile		1.31 (2)	5.05 (6)
Leu	1.05 (1)	6.86 (7)	19.46 (19)
Tyr		1.04 (1)	1.93 (2)
Phe	1.05 (1)	2.91 (3)	8.00 (8)
Lys	1.98 (2)	2.99 (3)	9.90 (11)
His		2.94 (3)	11.01 (11)
Arg			2.21 (2)
Cys		(1) (1)	3.08 (3)
Trp		(1) (1)	2.96 (4)
Sum	22	47	146

(*) In HpII liegt eine Ile-Ile-Bindung vor, die bei der 20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten wurde. Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

[illegible]

Aminosäuresequenzen der α^A - und β -Globinketten von Chrysemys picta beilli im homologen Vergleich mit α - und β -Ketten aus Human HbA. Die Balken A, B usw. kennzeichnen helikale Bereiche.

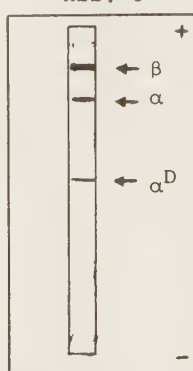
10. PHRYNOPS HILARII (Krötenkopfschildkröte)

Im Blut von *Phrynops hilarii* werden wie bei *Chrysemys picta bellii* zwei Hämoglobinkomponenten gefunden, die jedoch im Verhältnis von ca. 1 : 1 vorliegen^[4]. Abb. 5 zeigt das Hämoglobinmuster in der Disk-Elektrophorese, Abb. 6 die Aufspaltung der Ketten in der Triton-Elektrophorese.

Abb. 5



Abb. 6

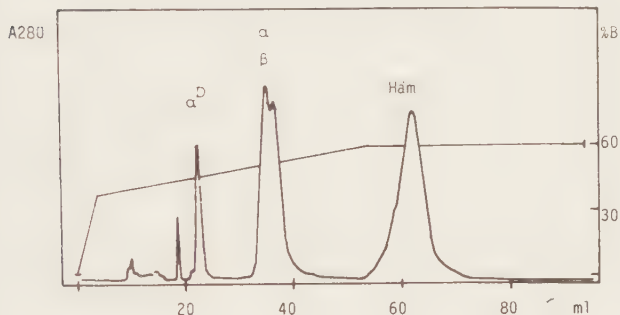


10.1 ISOLIERUNG DER α^D -KETTEN

Aus der Lösung der weniger basischen, in der Gelelektrophorese (nativ, pH 8,7) weiter wandernden Komponente CII wie auch aus dem Gesamthämolyolat konnten die α^D -Ketten mittels HPLC isoliert werden. Vor der Chromatographie wurden die Proben mit DTE reduziert um eine etwaige Polymerisation über Disulfidbrücken zu verhindern. In Diagramm 31 ist die Kettentrennung im Ammoniumacetat / Ameisensäure-System dargestellt. An RP2 LiChrosorb wurden reine α^D -Ketten in guten Ausbeuten (bis zu 80 %) isoliert. Auf eine vorhergehende Hämabspaltung konnte verzichtet werden, da das Häm in der

HPLC gut von den Proteingipfeln abgetrennt eluiert.

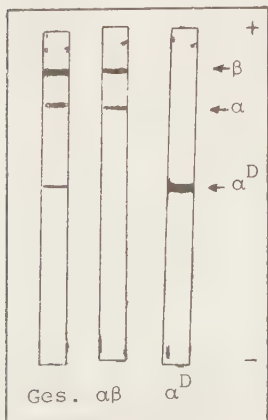
Diagramm 31



Isolierung der α^D -Ketten aus Gesamthämolyat mit HPLC
 Säule: 8,0 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m
 Puffer A: 0,1 M Ammoniumacetat, 5% Ameisensäure, pH 2,5
 B: Acetonitril
 Gradient: 0 - 37% B in 2 min
 37 - 60% B in 25 min
 Flußrate: 2 ml/min
 Probe: ca. 6 mg Hb in 0,5 ml

Abb. 7 zeigt die Analyse der Proteingipfel in der Triton-Elektrophorese.

Abb. 7



10.2 α^D -KETTEN

10.2.1 TRYPTISCHE SPALTUNG UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

Die Spaltung wurde gemäß Abschnitt 5.4.1 der Methoden an 7 mg (ca. 440 nmol) der nativen α^D -Ketten durchgeführt. Beim Absenken des pH auf 6,3 fiel eine geringe Menge Niederschlag aus. Er wurde abzentrifugiert und getrennt untersucht. Es ließen sich keine verwertbaren Peptide daraus isolieren. Der lösliche Überstand wurde lyophilisiert und im wässrigen HPLC-Puffer aufgenommen. Diagramm 32 zeigt den Verlauf der Trennung an einer RP2 LiChrosorb-Säule im Ammoniumacetat-system.

Diagramm 32

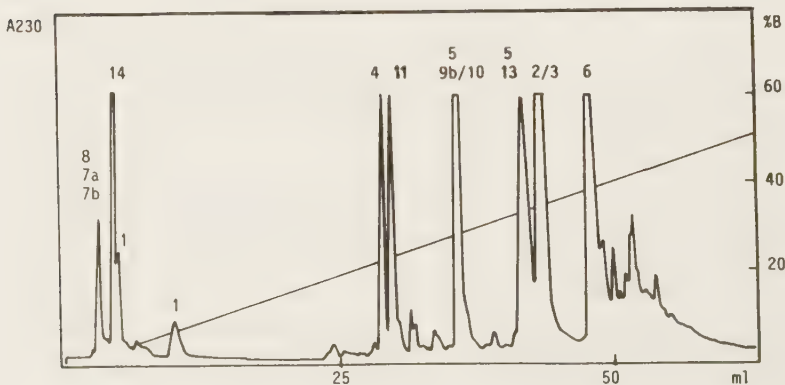
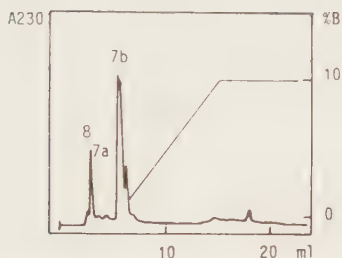


Diagramm 32a



Rechromatographie der Peptide Tp7a, Tp7b und Tp8 an einer RP 18 Säule

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 18, 7 μ m

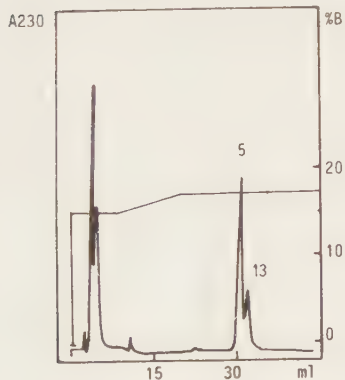
Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0

B: Acetonitril

Gradient: nach 5 min 0 - 10% B in 10 min

Flußrate: 1 ml/min

Diagramm 32b



Rechromatographie der Peptide Tp5 und Tp13 mit HPLC unter geänderten Bedingungen

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0

B: Acetonitril

Gradient: nach 1 min 15% B

nach 1% B/min, nach 11 min isokratisch

Flußrate: 1 ml/min

Die Peptide Tp1, Tp2/3, Tp4, Tp6, Tp11 und Tp14 wurden rein erhalten. Im Startgipfel eluierten Tp7a, Tp7b und Tp8 zusammen. Ihre Trennung erfolgte an RP18 LiChrosorb (Diagramm

32a). Tp5 eluierte in zwei Gipfeln, im ersten gemeinsam mit Tp9b/10, im zweiten zusammen mit Tp13. Tp9a und Tp12 kamen nicht mehr von der Säule. Eine nach jeder Einspritzung verschlechterte Trennleistung der Säule war die Folge.

Tp5 und Tp13 konnten durch Rechromatographie an RP2 LiChrosorb mit verdoppelter Flußrate und flacherem Gradienten separiert werden (Diagramm 32b). Die Trennung von Tp5 und Tp9b/10 gelang auf diese Weise nicht. Beim Versuch die beiden Fragmente an RP8 LiChrosorb zu trennen konnte nur Tp5 wiedergefunden werden (ohne Abb.). Die beiden Peptide wurden zusammen sequenziert. Ihre Trennung gelang später nach der tryptischen Spaltung des oxidierten N-terminalen hydrolytischen Peptids Hp I an einer RP2 Lichrosorb Säule, die mit Material aus einer anderen Produktionscharge gepackt war (Diagramm 34).

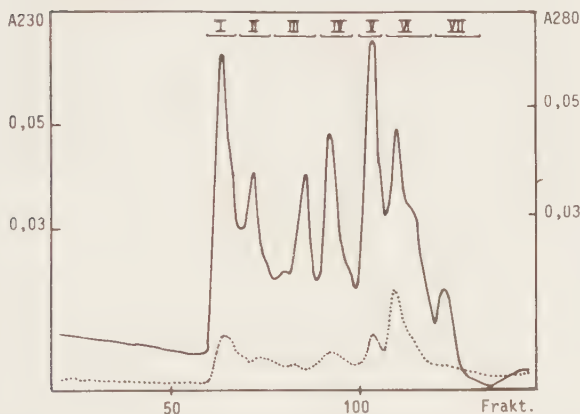
Isolierung von Tp9a:

Tp9a und Tp12 sind die längsten Peptide dieser Kette. Bei der tryptischen Spaltung des N-terminalen hydrolytischen Peptids Hp I fällt Tp9a als größtes Bruchstück an und kann durch Gelfiltration isoliert werden. Hp I wurde nach 5.4.1 der Methoden mit Trypsin nachgespalten. Der Verlauf der Gelfiltration über Sephadex G-25 ist in Diagramm 33 wiedergegeben. Gipfel I und II enthielten das gesuchte Peptid. Es war mit kleineren Peptiden leicht verunreinigt, was bei der Sequenzierung wenig störte (zumal diese schnell ausgewaschen wurden), was die Aminosäureanalyse aber verfälschte. Versuche Tp9a mittels HPLC nachzureinigen scheiterten.

Analytisch reines Tp9a wurde auf folgendem Weg erhalten: Nach 4.1 der Methoden kurz oxidierte Ketten wurden säure-

hydrolytisch gespalten. Das oxidierte Peptid Hp I wurde mit Trypsin verdaut (Abschnitt 5.4.1 der Methoden). Aus der erhaltenen Peptidmischung wurde das oxidierte Tp9a mit HPLC an RP2 LiChrosorb rein gewonnen (Diagramm 34).

Diagramm 33



Gelfiltration des tryptischen Hydrolysats von nativem Hp I

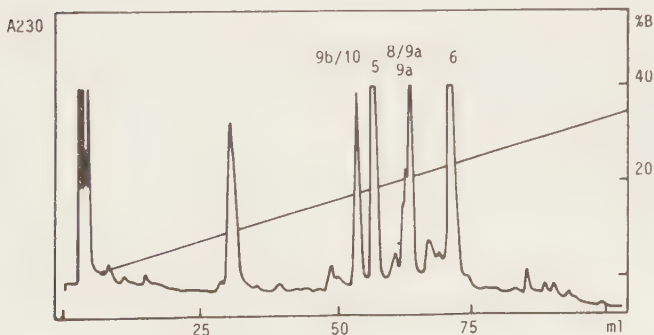
Säule: 2,5 x 220 cm; Sephadex G-25 fine

Eluens: 0,1 N Essigsäure

Flußrate: 22 ml/h

Fraktionen: 8,4 ml/23 min

Diagramm 34



HPLC des tryptischen Hydrolysats von oxidiertem Hp I

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 µm

Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat

B: Acetonitril

Gradient: nach 1 min 0 - 40% B in 60 min

Flußrate: 2 ml/min

Isolierung des ditryptischen Peptids Tp12/13:

Ungetrenntes Lyophilisat der Bromcyanpeptide wurde kurz bei niedrigem pH tryptisch nachgespalten (Abschnitt 5.4.1 der Methoden). Wie erwartet erfolgte unter diesen Bedingungen kaum Spaltung am Lys 127. Das ditryptische Peptid Tp12/13 fiel beim Absenken des pH auf 6,3 aus. Es wurde im Säuren aufgenommen und bei pH 5,8 erneut gefällt. Die endgültige Reinigung erfolgte mit HPLC im TFA-System (pH 2) an einer Vydac RP18 Säule (Diagramm 35).

Diagramm 35



HPLC des bei pH 6,3 unlöslichen Niederschlags aus der tryptischen Nachspaltung der Bromcyanpeptide

Säule: 4,6 x 250 mm; Vydac RP 18

Puffer A: 0,1 % TFA

B: Acetonitril

Gradient: nach 0,5 min 20% B

nach 2 min 20 - 60% B in 20 min

Flußrate: 1 ml/min

10.2.2 SAUREHYDROLYTISCHE SPALTUNG DER ASP-PRO-BINDUNG

Native und oxidierte α^D -Ketten wurden wie in Abschnitt 5.4.2 der Methoden beschrieben gespalten. Diagramme 36a und 36b zeigen die Trennung der Fragmente über Sephadex G-50. Die Entsalzung des Hp II bereitete Probleme. Das Peptid wurde beim Versuch, es wie üblich in 1 N Essigsäure über Sephadex G-25 zu entsalzen, verloren. Im Alkalischen war es schwer löslich. Die Entsalzung gelang schließlich über Biogel P4 in 10 %iger Ameisensäure.

Diagramm 36a

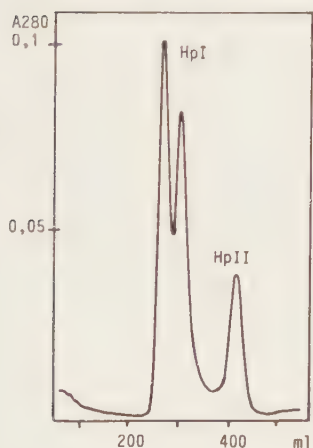
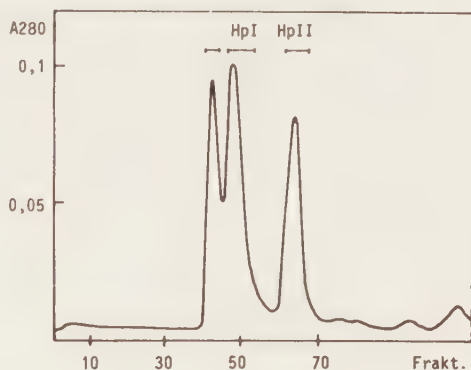


Diagramm 36b



Trennung der Peptidgemische nach der saurehydrolytischen Spaltung nativer (a) und oxidierter (b) Ketten

Säule: 2,5 x 190 cm; Sephadex G-50 fine

Eluens: 8 M Harnstoff in 10 % iger Ameisensäure

Flußrate: 23 ml/h

Fraktionen: 7,7 ml/20 min

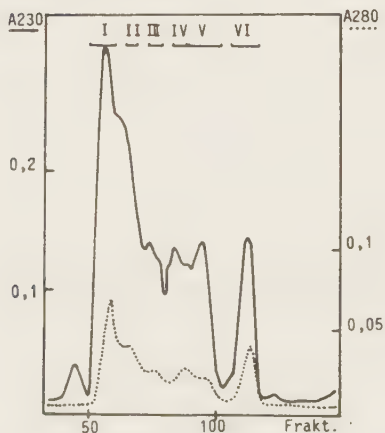
Bei der Sequenzanalyse des nativen Hp II konnten einige Schritte nicht aufgeklärt werden (siehe Sequenzierschema). Die Identifizierung erfolgte anhand des oxidierten Hp II.

10.2.3 BROMCYAN-SPALTUNG

Die Bromcyan-Spaltung war notwendig um durch Sequenzierung von CBp II die Positionen der bei der tryptischen Verdauung erhaltenen freien Aminosäuren Arg und Lys aufzuklären; außerdem wurde durch Abbau von CBp III die Sequenz von Pos. 77 - 82 ermittelt.

Die Spaltung an den Methioninen erfolgte wie in Abschnitt 5.4.3 der Methoden beschrieben. Diagramm 37 zeigt die Gel-filtration der Spaltprodukte über Sephadex G-50 fine in 0,1 N Essigsäure.

Diagramm 37

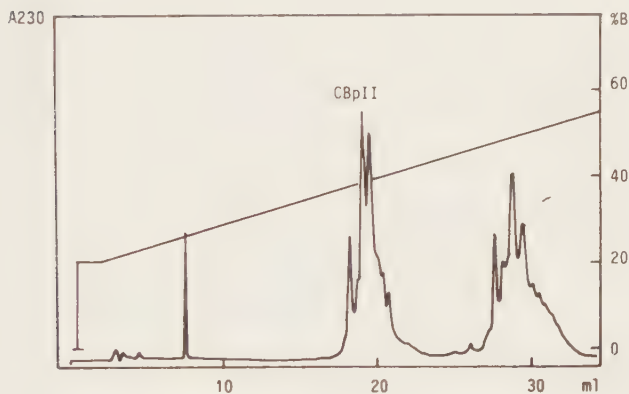


Vortrennung der Bromcyanpeptide an Sephadex G-50
 Säule: 2,5 x 170 cm; Sephadex G-50 superfine
 Eluens: 0,1 N Essigsäure
 Flußrate: 16 ml/h
 Fraktionen: 6,1 ml/23 min

Die Fraktionen I-III enthielten aggregiertes und teilweise gespaltenes Material. Fraktion IV enthielt ausschließlich

CBp III. In Fraktion VI lag CBp I in reiner Form vor. CBp II wurde mittels HPLC an Vydac RP18 aus Fraktion V isoliert (Diagramm 38).

Diagramm 38



Isolierung von CBpII aus Sephadexfraktion V mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; Vydac RP 18

Puffer A: 0,1 % TFA

B: Acetonitril

Gradient: nach 0,5 min 20% B

nach 2 min 20 - 60% B in 40 min

Flußrate: 1 ml/min

Tab. 4. *Phrynosoma hilerii*: α -D-Ketten

a) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide:

Pos.	Tp1 1-7	Tp2/3 8-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7a 57
Asx	1.04 (1)		1.03 (1)		1.02 (1)	
Thr			1.00 (1)	2.04 (2)	0.94 (1)	
Ser	1.05 (1)				0.92 (1)	
Glx	1.05 (1)	2.18 (2)	4.02 (4)	1.18 (1)	1.98 (2)	
Pro				0.91 (1)		
Gly			1.01 (1)		1.11 (1)	
Ala	1.04 (1)	0.97 (1)	1.89 (2)			
Val			0.88 (1)	1.10 (1)		
Met	(1) (1)			0.81 (1)		
Ile		0.93 (1)			0.91 (1)	
Leu	0.95 (1)	2.11 (2)	1.08 (1)		1.13 (1)	
Tyr				0.83 (1)	0.83 (1)	
Phe			1.04 (1)	0.96 (1)	2.03 (2)	
Lys	0.89 (1)	1.10 (1)		0.99 (1)		
His		0.70 (1)	1.94 (2)		4.26 (4)	
Arg			0.97 (1)		0.89 (1)	1.00 (1)
Cys						
Trp		(1) (1)				
Sum	7	9	15	9	16	1

Pos.	Tp7b 58-60	Tp8 61	Tp9a(*) 62-82	Tp9b/10 83-92	Tp11 93-99	Tp13 128-139	Tp14 140-141
Asx			2.83 (3)	1.96 (2)	2.14 (2)	0.96 (1)	
Thr							
Ser			0.94 (1)	1.02 (1)		0.88 (1)	
Glx			1.32 (1)			1.15 (1)	
Pro					0.89 (1)		
Gly	1.05 (1)						
Ala			3.68 (4)	1.03 (1)		2.90 (3)	
Val			3.27 (4)		1.89 (2)	1.91 (2)	
Met			0.88 (1)				
Ile							
Leu			3.33 (3)	3.07 (3)		2.05 (2)	
Tyr				0.72 (1)			1.02 (1)
Phe					1.05 (1)	1.12 (1)	
Lys	1.00 (1)	1.00 (1)	1.21 (1)		1.03 (1)	1.02 (1)	
His	0.95 (1)		2.03 (2)	1.30 (1)			
Arg				0.88 (1)			0.98 (1)
Cys			1.00 (1)				
Trp							
Sum	3	1	21	10	7	12	2

(*) In Tp9a liegen zwei Val-Val-Bindungen vor, die bei der 20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten wurden.

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 4. *Phrynosoma hilarii*: α^D -Ketten
 b) Aminosäureanalysen der Peptide aus der hydrolytischen
 Spaltung (HpII) und aus der Bromcyan-Spaltung (CBpII,
 CBpIII), sowie der α^D -Ketten.

Pos.	HpII (*) 95-141	CBpII 33-73	CBpIII(*) 74-141	Globin 1-141
Asx	3.19 (3)	2.25 (2)	7.35 (8)	12.08 (12)
Thr		2.93 (3)		3.86 (4)
Ser	2.46 (3)	1.10 (1)	4.38 (5)	7.11 (7)
Glx	4.18 (4)	5.51 (5)**	5.48 (4)	16.06 (15)
Pro	2.00 (2)	0.96 (1)	2.28 (2)	3.27 (3)
Gly	2.10 (2)	2.14 (2)	2.14 (2)	5.49 (5)
Ala	4.70 (5)	2.22 (2)	7.90 (8)	13.10 (14)
Val	6.01 (7)	4.65 (5)	7.13 (8)	13.74 (14)
Met				2.80 (3)
Ile		0.98 (1)		2.05 (2)
Leu	6.17 (6)	2.33 (2)	10.28 (11)	17.69 (17)
Tyr	2.49 (3)	1.54 (2)	2.86 (4)	6.04 (6)
Phe	3.09 (3)	2.72 (3)	3.36 (3)	6.90 (7)
Lys	3.09 (3)	3.10 (3)	4.39 (4)	8.95 (9)
His	4.40 (4)	7.80 (7)	6.73 (5)	15.64 (15)
Arg	1.05 (1)	1.82 (2)	2.05 (2)	4.74 (5)
Cys	0.96 (1)		(2) (2)	2.06 (2)
Trp				1.14 (1)
Sum	47	41	68	141

(*) Eine Val-Val-Bindung wurde bei der 20h Hydrolyse nicht gespalten.

** Der Wert setzt sich zusammen aus 4 Glx und 1 Homoserinlacton.

NA	A	Pro-Ala-Asp	Thr-Asn-Val-Lys-Ala	Gly	AB	Ala-Gly-Glu-Tyr	
Val		Met-Leu-Ser-Ala-Asp-Glu-Lys-Gln-Ile-Leu-His-Ala-Trp-Glu-Lys-Val-His-Thr-His-Gln-Glu-Asp-Phe-Gly-Ala-Glu-Ala	10			20	30
Met-Leu-Ser-Ala-Asp-Glu-Lys-Gln-Ile-Leu-His-Ala-Trp-Glu-Lys-Val-His-Thr-His-Gln-Glu-Asp-Phe-Gly-Ala-Glu-Ala							
1							
	C	Leu-Ser-Phe	Thr	CD	Pro	E	
-Arg-Met-Phe-Thr-Val-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-His-His-Phe-Asp-Leu-His-Ser							
31							
		Ala-Asp	Thr	EF	Ala	F	FG
-Lys-Val-Val-Ala-Leu-Glu-Asn-Ala-Val-His-His-Met-Asp-Leu-Ser-Ala-Ala-Leu-Cys-Lys-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-Tyr-Asn-							
61							
	G						
-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-Cys-Phe-His-Val-Leu-Ala-Gly-His-Leu-Glu-Tyr-Ser							
91							
		Ala-Ser-Leu	Ser				
-Val-His-Val-Ala-Tyr-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Asp-Val-Leu-Ala-Glu-Lys-Tyr-Arg							
121							

Aminosäuresequenz der α^D -Globinketten von Phrynos hilarii im homologen Vergleich mit den α -Ketten aus Human HbA. Die Balken A, B usw. kennzeichnen helikale Bereiche.

11. IGUANA IGUANA (Grüner Leguan)

Das Blut von *Iguana iguana* stammte von einem einzigen adulten Tier. Das Hämoglobin ergibt drei Banden in der nicht denaturierenden Elektrophorese. Alle drei Banden sind sehr unscharf (Abb. 8). Die Auftrennung ist infolgedessen nur bei sehr kleinen Auftragsmengen erkennbar. Reduktion der Proben mit DTE erbrachte keine deutlicheren Resultate.

Abb. 8



11.1 KOMPONENTENTRENNUNGEN

Diagramm 39 zeigt den Verlauf der Chromatographie von reduziertem Hamolysat an CM-Cellulose, Diagramm 40 den an DEAE Sephacel. Untersuchung der Gipfel in der Diskelektrophorese ergab Banden, die wegen ihrer Breite nicht zugeordnet werden konnten (ohne Abb.). Die Analyse in der Tritonelektrophorese lieferte jeweils mehr als zwei Banden (Abb. 9). Die genannten Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Instabilität der Leguanhämoglobine hin. Weitere Versuche zur Klärung

dieses Verhaltens wurden nicht unternommen, da das Hauptinteresse den Primärstrukturen je einer α - und β -Globinkette eines Vertreters der Unterordnung Sauria (Ordnung Squamata) galt.

Diagramm 39

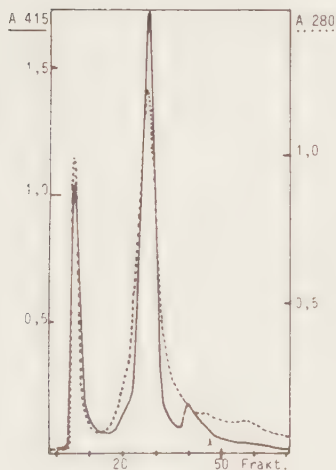


Diagramm 40

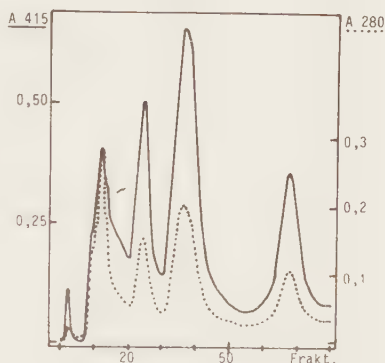


Diagramm 39

Chromatographie an CM 52 Cellulose:

Säule: CM 52; 1,6 cm x 12 cm

Startpuffer: 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9; 0,001 M DTE

Gradient: linear 150 ml 0,01 M Natriumphosphat; pH 6,9;
0,001 M DTE

150 ml 0,10 M Natriumphosphat; pH 6,9;
0,001 M DTE

Flußrate: 20 ml/h

Fraktionen: 5 ml/15 min

Probe: 50 mg Hämoglobin in 10 ml Startpuffer

Diagramm 40

Chromatographie an DEAE-Sephacel:

Säule: DEAE-Sephacel, 1,6 cm x 14 cm

Startpuffer: 0,05 M Tris/HCl; pH 8,4; 0,001 M DTE

Gradient: linear 250 ml Startpuffer
250 ml Startpuffer + 0,15 M NaCl

Flußrate: 20 ml/h

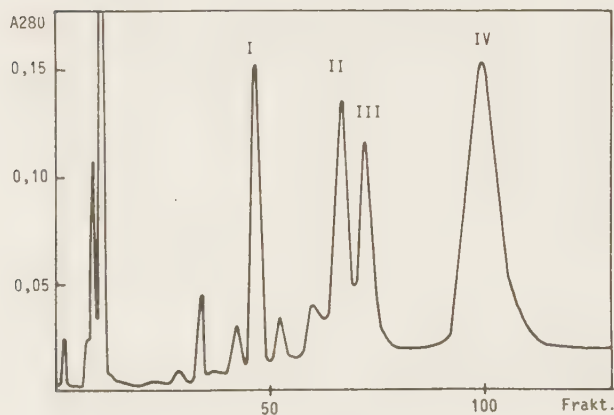
Fraktionen: 5 ml/15 min

Probe: 50 mg Hämoglobin in 10 ml Startpuffer

11.2 KETTENTRENNUNG

In der denaturierenden Tritonelektrophorese des frischen Hämolysats werden drei Banden gefunden. Durch Chromatographie des Globins an CM 52 Cellulose (Diagramm 41) konnten in Gipfel I reine α -Ketten, in den Gipfeln II und III verschiedene β -Ketten und in Gipfel IV Aggregate aus α - und β -Ketten isoliert werden.

Diagramm 41



Kettentrennung an CM 52 Cellulose

Säule: 2,5 x 17 cm

Startpuffer: 0,02 M Natriumacetat; 8 M Harnstoff;
0,2% Mercaptoethanol; HCl ad pH 5,0

Gradient A: logarithmisch 600 ml Startpuffer

800 ml Startpuffer + 0,13 M NaCl

Gradient B: logarithmisch 500 ml Startpuffer + 0,3 M NaCl

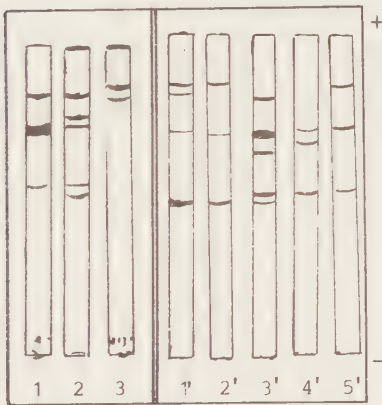
Flußrate: 40 ml/h

Fraktionen: 10 ml/15 min

Probe: 100 mg Globin in 10 ml Startpuffer; pH 5,0

Die Gipfel wurden in der Tritonelektrophorese analysiert (Abb.10). Die kompletten Sequenzen der α -Ketten aus Gipfel I sowie der β -Ketten aus Gipfel III wurden ermittelt. N-terminaler Edman-Abbau (30 Schritte) der Ketten aus Gipfel II zeigte, daß es sich um β -Ketten handelt. 10 N-terminale Sequenzschritte an Gipfel VI ließen das Vorliegen von α - und β -Ketten erkennen. Eine nähere Untersuchung erfolgte nicht.

Abb. 9



Komponententrennungen

Tritonelektrophorese:

1=Iguana ig. Gesamtglobin
 2=Frakt. 8 (siehe Dia.39)
 3= " 27 " " "
 1= " 10 " " 40
 2= " 26 " " "
 3= " 40 " " "
 4= " 70 " " "
 5=Iguana ig. Gesamtglobin

Abb. 10



Kettentrennung

Tritonelektrophorese:

I=Gipfel I α -Ketten
 II= " II β -Ketten
 III= " III β -Ketten
 IV= " IV Aggregate
 Ges.= Gesamtglobin

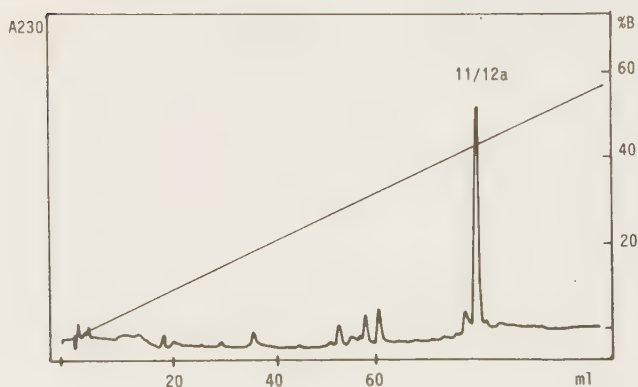
(Sequenziert wurden
 α -Ketten aus Gipfel I u.
 β -Ketten " " III)

11.3 α -KETTEN

11.3.1 TRYPTISCHE SPALTUNG UND ISOLIERUNG DER PEPTIDE

18 mg der nach 4.1 der Methoden oxidierten α -Ketten wurden wie in Abschnitt 5.6.1 beschrieben tryptisch gespalten. Das Peptid Tp11/12a wurde bei pH 4,8 ausgefällt. Es wurde in 0,01 N NaOH aufgenommen und mit HPLC im Ammoniumacetatsystem an RP2 LiChrosorb nachgereinigt (Diagramm 42).

Diagramm 42



Reinigung von Tp11/12a mittels HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat

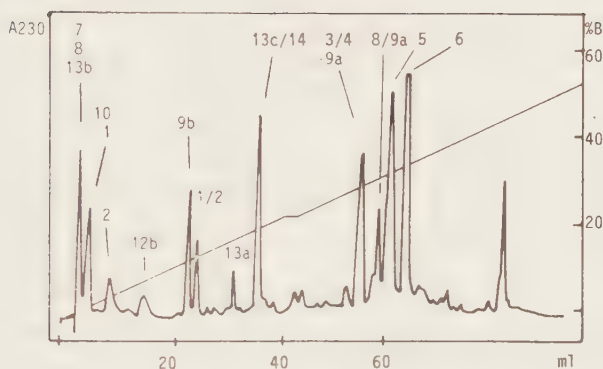
B: Acetonitril

Gradient: nach 1 min 0 - 60% B in 60 min

Flußrate: 2 ml/min

Die Peptide der löslichen Fraktion wurden ebenfalls der HPLC an RP 2 LiChrosorb unterworfen (Diagramm 43).

Diagramm 43



HPLC der bei pH 4,8 löslichen tryptischen Peptide

Säule: 4,6 x 250 mm; LiChrosorb RP 2, 7 μ m

Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat

B: Acetonitril

Gradient: nach 1 min 0 - 60% B in 60 min

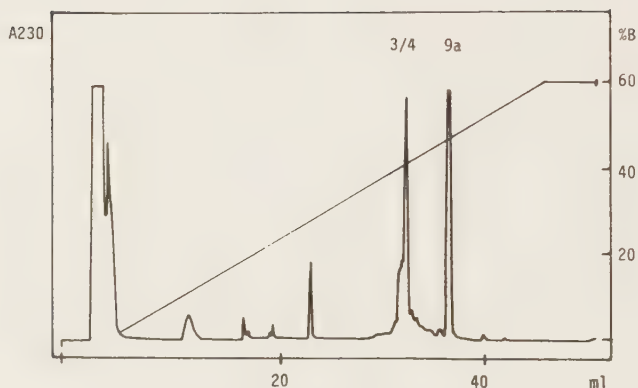
nach 19 min isokratisch für 2 min

Flußrate: 2 ml/min

Das ditryptische Peptid Tp1/2 sowie die Peptide Tp2, Tp5, Tp6, Tp9b, Tp12b, Tp13a und Tp13c/14 konnten auf diese Weise rein isoliert werden. Tp7, Tp8 und Tp13b eluierten mit dem Start. Ihre Trennung erfolgte mittels präparativer Dünnschichtelektrophorese (Abb. 11). Mit dieser Methode wurden auch Tp1 und Tp10 separiert.

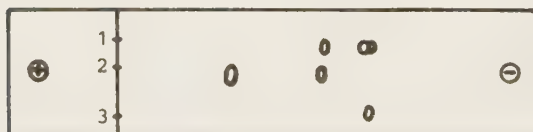
Tp3/4 und Tp9a eluierten zusammen von der RP 2 Säule, das ditryptische Peptid Tp8/9a war verunreinigt. Die Trennung von Tp3/4 und Tp9a (Diagramm 43a) sowie die Reinigung von Tp8/9a erfolgte durch Rechromatographie an Vydac RP 18 μ m TFA-System.

Diagramm 43a



Trennung von Tp3/4 und Tp9a mit HPLC
 Säule: 4,6 x 250 mm; Vydac RP 18
 Puffer A: 0,1 % TFA
 B: Acetonitril
 Gradient: nach 5 min 0 - 60% B in 40 min
 Flußrate: 1 ml/min

Abb. 11

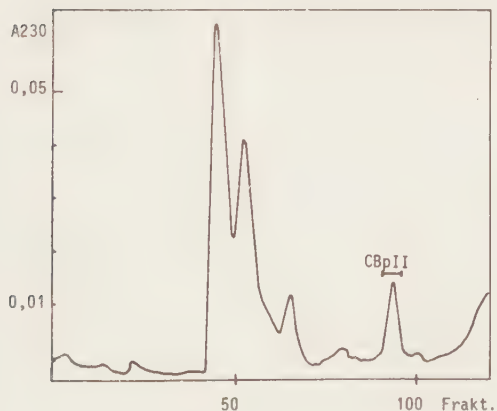


Trennung von Tp13b, Tp7 u. Tp8 (Bahn 1: v.l.n.r.)
 sowie von Tp1 u. Tp10 (Bahn 2: v.l.n.r.) mittels
 Dünnschichtelektrophorese. Bahn 3: Lys (Referenz).

11.3.2 BROMCYAN-SPALTUNG

Eine verlässliche Zuordnung der tryptischen Peptide des C-terminalen Bereichs konnte durch Analyse des C-terminalen Bromcyanpeptids CBp II erzielt werden. 15 mg nach 4.2 der Methoden reduzierte Ketten wurden mit 1 g Bromcyan 18 h lang behandelt. (Der große Überschuß an Bromcyan und die lange Zeit wurden gewählt, da nach Reaktion mit 300 mg BrCN für 5h durch N-terminalen Edman-Abbau keine Spaltung nachgewiesen werden konnte.) Das lyophilisierte Reaktionsgemisch wurde in 6 M Guanidinlösung aufgenommen und über Sephadex G-50 fine in 0,1 N Essigsäure getrennt. Das gesuchte Peptid CBp II eluierte in einem basisliniengetrennten Gipfel (Diagramm 44).

Diagramm 44



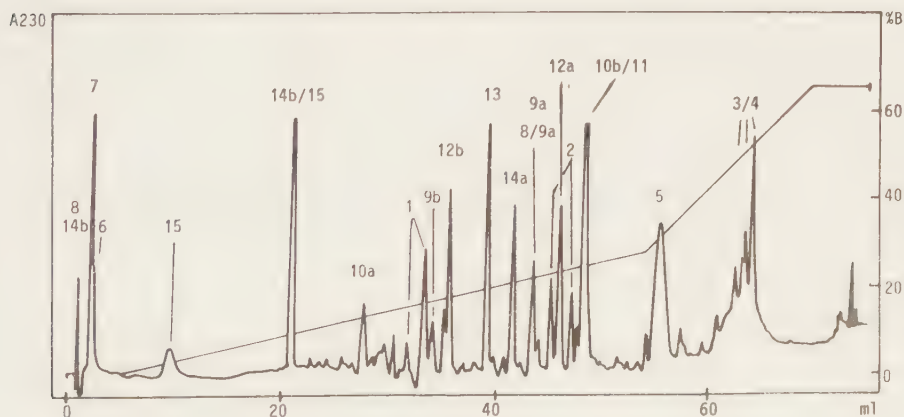
Gelfiltration der Peptide nach der Bromcyanspaltung
 Säule: 2,5 x 170 cm; Sephadex G-50 superfine
 Eluens: 0,1 N Essigsäure
 Flußrate: 23 ml/h
 Fraktionen: 7,7 ml/20 min

11.4 β -KETTEN

11.4.1 TRYPTISCHE SPALTUNG UND TRENNUNG DER PEPTIDE

Die tryptische Spaltung erfolgte wie in Abschnitt 5.6.1 der Methoden beschrieben. Die tryptischen Peptide wurden ohne Vorfraktionierung mit HPLC im TFA-System an Vydac RP 18 getrennt. In Diagramm 45 ist das Elutionsprofil wiedergegeben. Alle Peptide konnten separiert werden, die Tryptophan-haltigen Fragmente Tp1 und Tp2 allerdings in niedrigen Ausbeuten auf je zwei Gipfel verteilt. Das ebenfalls Trp-haltige Peptid Tp3/4 eluierte in mehreren benachbarten Gipfeln. Durch Vortrennung des Hydrolysates über Sephadex G-25 und Rechromatographie der entsprechenden Fraktionen an Vydac RP 18 wurde die Ausbeute an Tp1 u. Tp2 verbessert (ohne Abb.).

Diagramm 45



HPLC des tryptischen Hydrolysats der β -Ketten

Säule: 4,6 x 250 mm; Vydac RP 18

Puffer A: 0,1 % TFA

B: Acetonitril + 0,1% TFA

Gradient: nach 5 min 0 - 40% B in 60 min

nach 55 min T 65% B in 15 min

Flußrate: 1 ml/min

Tab. 5. *Iguana iguana*: α -Ketten

a) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide:

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3/4 12-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61	Tp9a (*) 62-82
Asx	2.09 (2)	1.04 (1)	2.81 (3)		2.03 (2)			5.66 (6)
Thr	0.89 (1)		0.94 (1)	0.97 (1)	0.93 (1)			1.02 (1)
Ser					0.84 (1)			
Glx	1.03 (1)		1.96 (2)		1.04 (1)			1.08 (1)
Pro			0.92 (1)	1.04 (1)	0.97 (1)			1.07 (1)
Gly			2.50 (2)		1.14 (1)	1.14 (1)		
Ala			2.77 (3)	1.99 (2)	2.02 (2)	0.84 (1)		3.84 (4)
Val	0.79 (1)		1.67 (2)					2.30 (3)
Met								
Ile		0.92 (1)	0.84 (1)		0.91 (1)			0.94 (1)
Leu	1.16 (1)		1.02 (1)	2.05 (2)	1.11 (1)			3.25 (3)
Tyr				0.93 (1)	0.92 (1)			
Phe			1.12 (1)	1.03 (1)	1.91 (2)			
Lys	1.04 (1)			1.04 (1)	1.09 (1)	1.01 (1)	1.00 (1)	1.12 (1)
His		1.01 (1)	1.20 (1)		1.10 (1)	1.02 (1)		
Arg		1.03 (1)	1.26 (1)					
Cys								
Trp			(1) (1)					
Sum	7	4	20	9	16	4	1	21

Pos.	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11/12a 93-118	Tp12b 119-127	Tp13a 128-131	Tp13b 132-134	Tp13c/14 135-141
Asx	1.00 (1)		2.87 (3)	1.94 (2)			
Thr			0.94 (1)		0.94 (1)		0.93 (1)
Ser				0.88 (1)			
Glx	1.03 (1)						
Pro			2.29 (2)				
Gly			3.03 (3)				
Ala	1.78 (2)		2.02 (2)	1.90 (2)		1.01 (1)	1.07 (1)
Val			2.82 (3)	0.93 (1)		0.85 (1)	1.00 (1)
Met				1.01 (1)			
Ile			1.85 (2)				
Leu	2.15 (2)	0.87 (1)	4.11 (4)	1.22 (1)	1.09 (1)		1.18 (1)
Tyr							0.88 (1)
Phe			1.03 (1)		0.93 (1)		
Lys	1.06 (1)		1.09 (1)	1.13 (1)	1.04 (1)	1.14 (1)	
His	0.98 (1)		2.87 (3)				1.03 (1)
Arg		1.12 (1)					0.91 (1)
Cys			1.09 (1)				
Trp							
Sum	8	2	26	9	4	3	7

(*) In Tp9a liegt eine Val-Val-Bindung vor, die bei der 20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten wurde.

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 5. *Iguana iguana*: α -Ketten

b) Aminosäureanalysen des ditryptischen Peptids Tp8/9a. des Peptids aus der Bromcyan-Spaltung (CBpII) sowie der intakten α -Ketten.

Pos.	Tp8/9a 61-82	CBpII 126-141	Globin 1-141
Asx	5.79 (6)	1.42 (1)	18.45 (20)
Thr	0.97 (1)	1.71 (2)	7.56 (8)
Ser			2.17 (2)
Glx	1.16 (1)		6.53 (6)
Pro	1.06 (1)		5.25 (6)
Gly			7.39 (7)
Ala	3.94 (4)	2.08 (2)	18.55 (20)
Val	2.45 (3)(*)	1.99 (2)	11.94 (12)
Met			0.78 (1)
Ile	0.97 (1)		5.97 (6)
Leu	3.00 (3)	2.16 (2)	17.08 (18)
Tyr		0.86 (1)	2.84 (3)
Phe		0.98 (1)	5.66 (6)
Lys	2.13 (2)	2.64 (3)	11.02 (11)
His		1.22 (1)	8.59 (9)
Arg		0.94 (1)	4.03 (4)
Cys			1.45 (1)
Trp			(1) (1)
Sum	22	16	141

(*) Eine Val-Val-Bindung wurde bei der 20h Hydrolyse nicht quantitativ gespalten.

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 6. *Iguana iguana*: β -Ketten

a) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide:

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3/4 18-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65
Asx			1.36 (1)	3.88 (4)		
Thr	1.03 (1)	0.98 (1)	1.85 (2)			
Ser				0.69 (1)		
Glx	2.02 (2)	1.99 (2)	2.85 (3)			
Pro			1.13 (1)	0.97 (1)		
Gly		1.19 (1)	2.27 (2)	2.13 (2)		1.04 (1)
Ala	1.10 (1)		2.52 (2)	3.72 (4)		1.00 (1)
Val	0.78 (1)	0.92 (1)	2.42 (3)		1.03 (1)	
Met						
Ile		0.93 (1)	1.56 (2)	0.93 (1)		
Leu		1.08 (1)	2.95 (3)	1.27 (1)		
Tyr			0.80 (1)			
Phe				2.82 (3)		
Lys	1.08 (1)	1.02 (1)		1.15 (1)	0.97 (1)	1.02 (1)
His	1.29 (1)					0.95 (1)
Arg			0.80 (1)			
Cys			1.12 (1)	1.16 (1)		
Trp	(1) (1)	(1) (1)	(1) (1)			
Sum	8	9	23	19	2	4

Pos.	Tp8 66	Tp9a (*) 67-76	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10/11 88-104	Tp12a 105-113
Asx		0.98 (1)	2.84 (3)	0.86 (1)	2.95 (3)	1.08 (1)
Thr		0.86 (1)		1.05 (1)		1.03 (1)
Ser		0.92 (1)			0.83 (1)	
Glx					0.97 (1)	
Pro					0.94 (1)	
Gly		1.29 (1)				1.05 (1)
Ala		1.09 (1)		1.14 (1)		
Val		1.77 (2)			2.16 (2)	1.06 (1)
Met						0.80 (1)
Ile			0.96 (1)			0.94 (1)
Leu		1.05 (1)	1.06 (1)		2.98 (3)	2.01 (2)
Tyr						
Phe		1.04 (1)		0.99 (1)	1.23 (1)	
Lys	1.00 (1)	1.39 (1)	1.14 (1)	0.97 (1)	1.28 (1)	
His					1.79 (2)	
Arg					0.93 (1)	1.04 (1)
Cys					0.95 (1)	
Trp						
Sum	1	10	6	5	17	9

(*) Tp9a war mit dem ditryptischen Peptid Tp8/9a verunreinigt wodurch der Analysenwert für Lys erhöht ist.
Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Tab. 6. *Iguana iguana*: β -Kettena) Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide (Fortsetzung) und der intakten β -Ketten:

Pos.	Tp12b 105-113	Tp13 121-132	Tp14a 133-143	Tp14b 144	Tp15 145-146	Globin 1-146
Asx		0.96 (1)				14.87 (15)
Thr		0.98 (1)	1.08 (1)			8.85 (9)
Ser						3.36 (3)
Glx		1.09 (1)				8.83 (9)
Pro		0.90 (1)				3.99 (4)
Gly	0.99 (1)		1.14 (1)			10.10 (10)
Ala	1.90 (1)	2.85 (3)	3.72 (4)			18.26 (19)
Val			0.98 (1)			11.78 (12)
Met						0.98 (1)
Ile						5.65 (6)
Leu	1.07 (1)		2.04 (2)			15.20 (15)
Tyr					1.02 (1)	2.13 (2)
Phe	0.96 (1)	2.01 (2)				8.38 (9)
Lys	1.03 (1)	1.12 (1)				12.58 (12)
His	1.04 (1)	1.07 (1)	1.07 (1)		0.98 (1)	9.26 (8)
Arg			0.95 (1)	1.00 (1)		5.44 (5)
Cys		1.11 (1)				3.04 (4)
Trp						2.58 (3)
Sum	7	12	11	1	2	146

Met und Cys wurden nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

IV. D I S K U S S I O N

12. CHRYSEMYS PICTA BELLII

Die Zierschildkröte *Chrysemys picta bellii* gehört zur Familie der Sumpfschildkröten (Emydidae) und damit zur Unterordnung der Halsberger-Schildkröten (Cryptodirae). Ihr Verbreitungsgebiet ist der Norden der USA sowie das südliche Canada. Die Tiere leben im Süßwasser und verbringen die meiste Zeit unter Wasser. Nur gelegentlich kommen sie zum Atmen an die Oberfläche. Zum Sonnenbad verlassen sie mitunter das Wasser. Sie überwintern 5-6 Monate lang im kalten Gewässer, das nicht selten von einer Eisschicht bedeckt ist, oder im Bodenschlamm vergraben. Dabei ist für die Tiere kein oder nur sehr wenig Sauerstoff verfügbar.

In Laborexperimenten wurde gezeigt, daß die Schildkröten 6 Monate in anoxischem Wasser bei $+3^{\circ}\text{C}$ überleben können^[27]. Sie reduzieren dabei ihren Stoffwechsel auf ein Minimum, der arterielle Sauerstoffpartialdruck geht gegen Null, der arterielle pH sinkt von Anfangswerten um pH 8,0 auf Werte um pH 7,0 und Plasma-Lactat-Konzentrationen können 200 mM übersteigen^[28,29]! Aus Laborversuchen geht weiter hervor, daß die Tiere aus Wasser, das mit Sauerstoff gesättigt ist, Sauerstoff (vermutlich über die Haut) aufnehmen können^[30]. Der arterielle pO_2 sinkt dann zwar auf Werte unter 2 mm Hg, bleibt jedoch über Null, der arterielle pH fällt nur noch auf Werte um pH 7,7 und die Plasma-Lactat-Konzentration steigt nur auf etwa 50 mM. Zur Aufnahme von Sauerstoff aus

dem Wasser unter diesen Bedingungen wird ein Hämoglobin mit hoher Sauerstoffaffinität benötigt, da am extrapulmonären Gasaustausch nur Mund- und Kloakenöffnung sowie Integument beteiligt sein dürften.

Wenn in den oben genannten Experimenten die Tiere Zugang zur Luft hatten, dann konnten sie Lactatspiegel und arteriellen pH konstant halten^[30]. Der arterielle pO_2 sank auf durchschnittlich 2,6 mm Hg. Maginniss et al.^[31] bestimmten den $p50$ von Vollblut von Tieren im Sommer und im Winter unter in vivo Bedingungen. Im Winter (chronische Hypoxie) liegt der $p50$ bei 3,7 mm Hg ($3^{\circ}C$, pH 7,30). Das Hämoglobin gewährleistet also eine beträchtliche Sättigung bei dem oben genannten Sauerstoffpartialdruck von 2,6 mm Hg. Im Sommer (normoxische Tiere) hat das Vollblut einen $p50$ von 4,5 mm Hg ($3^{\circ}C$, pH 8,03); berücksichtigt man den Bohreffekt, dann sollte der $p50$ der Sommer-Tiere bei pH 7,30 größer sein als 4,5 mm Hg. Die offensichtliche Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bei chronischer Hypoxie kann erklärt werden durch ein gleichzeitiges Absinken der ATP-Konzentration im Erythrozyten von 6,1 mmolar (im Sommer) auf 0,75 mmolar (im Winter).

Wood et al.^[32] beschrieben eine entsprechende Anpassung an hypoxische Bedingungen beim Aal. Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wird erhöht, die ATP-Konzentration im Erythrozyten sinkt.

Hämoglobin-Phosphat-Wechselwirkung:

Organische Phosphate senken als allosterische Effektoren die Sauerstoffaffinität tetramerer Hämoglobine^[33,34]. Die Polyphosphatanionen schieben sich in die Spalte zwischen den β -Ketten, treten dort in Wechselwirkung mit positiv geladenen Resten, bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein und stabilisieren so dessen T-Struktur.

Bei Säugern ist 2,3-DPG der Effektor. Strukturanalysen am adulten Humanhämoglobin ergaben folgende Bindungsstellen^[35]: Val NA1(1) β , His NA2(2) β , Lys EF6(82) β und His H21(143) β .

Die Bindungsstellen für IPP, den allosterischen Effektor bei Vögeln, sind die gleichen wie bei Säugern, nur ist H21 β His durch Arg ersetzt; zusätzlich sorgen Arg H13(135) β und His H17(139) β für eine Kompensation der negativen Ladungen^[36].

Bei manchen Fischen wirken ATP bzw. GTP als allosterische Effektoren. Folgende Bindungsstellen wurden von Perutz et al.^[37] ermittelt: Val NA1(1) β_2 , Asp od. Glu NA2(2) β_1 , Lys EF6(82) β_1 u. β_2 und Arg H21(143) β_1 ; darüberhinaus kann Asp FG3(79) β_1 durch Bildung einer Wasserstoffbrücke die Bindung zum ATP stabilisieren.

Weber et al.^[38] bestätigten an Lösungen der isolierten Hämoglobine von *Chrysemys picta bellii*, daß ATP als allosterischer Effektor die Sauerstoffaffinität beider Hämoglobine drastisch senkt. ATP ist das vorherrschende organische Phosphat in den Erythrocyten dieser Schildkröte. Die intrinsischen Sauerstoffaffinitäten von HbA und HbD sind mit p50-Werten von 1.8 mm Hg und 3.5 mm Hg (20°C, pH 7.28) ungewöhnlich hoch. In Anwesenheit von ATP sind die p50-Werte 5-6

fach erhöht. DPG hat eine nur geringfügig kleinere Wirkung. Es überrascht nicht, daß beide Hämoglobine in gleicher Weise auf ATP bzw. DPG reagieren, haben doch beide die gleichen β -Ketten. Erstaunlich ist jedoch, daß die organischen Phosphate überhaupt einen so großen Einfluß auf diese Hämoglobine haben.

Die Sequenzanalyse der β -Ketten ergibt: Die ATP-Bindungsstellen Asp od. Glu NA2 β und Arg H21 β sind bei *Chrysemys picta bellii* ersetzt durch His NA2 β und Leu H21 β . ATP kann also nicht ebenso wie bei Fischen vorgeschlagen gebunden werden. Beim menschlichen fötalen Hämoglobin wird die geringe Wirkung von DPG mit dem Verlust von positiver Ladung in der zentralen Cavität H21 β His $\rightarrow$ Ser gedeutet, außerdem nimmt man an, daß die voluminöse Seitenkette von NA3 γ Phe den N-Terminus räumlich verschiebt und die Bindungen von Val NA1 γ sowie His NA2 γ zum DPG schwächt^[39,40,41]. Bei *Chrysemys picta bellii* findet man in NA3 β Trp, dessen Seitenkette noch voluminöser ist und in H21 β Leu, das ebenfalls ungeladen ist; trotzdem senkt DPG die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins der Schildkröte stark. Die sterischen Verhältnisse der Phosphatbindung müssen beim Hämoglobin von *Chrysemys picta bellii* verändert sein gegenüber den bisher untersuchten Hämoglobinen mit ATP-modifizierter Sauerstoffaffinität.

Es ist unklar welche Aminosäuren für die Phosphatbindung verantwortlich sind. Möglicherweise sind EF4(80) β His, F6(90) β Lys, H10(132) β Lys und H17(139) β His, die im Bereich der Spalte zwischen den β -Ketten liegen, an der Bindung beteiligt.

Struktur-Funktions-Beziehungen:

Im Hämoglobin von *Chrysemys picta bellii* findet man viele Substitutionen, die Einfluß auf die Funktion des Moleküls nehmen sollten. Bei Säugern bildet die Carboxylgruppe des C-terminalen His HC3(146) β in der R-Struktur eine Salzbrücke zum Lys HC1(144) derselben β -Kette[37]. Bei *Chrysemys* ist Lys durch Gly ersetzt, die Salzbrücke kann nicht gebildet werden, die R-Struktur sollte destabilisiert werden. Der Verlust dieser Salzbrücke führt jedoch im Hb Andrew-Minneapolis zu einer erhöhten Sauerstoffaffinität[42,43]. In der T-Struktur des Humanhämoglobins bildet Asp FG1(94) β eine Salzbrücke zu His HC3(146) β und trägt so zum alkalischen Bohreffekt bei[44,45]. Glu FG1 β bei *Chrysemys* kann die gleiche Salzbrücke bilden, jedoch konkurriert hier Lys F6(90) β (eine Helixwindung nach Glu FG1) mit His HC3 β um diese Bindung und destabilisiert die T-Struktur, andererseits könnte Lys F6 β im Oxyhämoglobin eine Salzbrücke zur Carboxylgruppe von His HC3 β bilden und Tyr HC2 β zwischen F und H Helix wie in der T-Struktur drängen. Fermi und Perutz[43] deuten so die erniedrigte Sauerstoffaffinität von Hb Azenogi. His EF4(80) β kann ebenfalls die Sauerstoffaffinität des Schildkrotenhämoglobins beeinflussen. In Hb Szuhu ist Asn EF4(80) β durch die basische Aminosäure Lys ersetzt, wodurch die Sauerstoffaffinität drastisch erhöht wird[44,46,47]. Die hydrophoben Seitenketten von Gly HC1(144) β und Leu H21(143) β bei *Chrysemys* werden in der wassergefüllten Spalte zwischen den β -Ketten eine andere Position einnehmen als die hydrophilen von Lys HC1 β und His H21 β bei den Säugerhämoglobinen und dadurch die Raumstruktur

des C-Terminus verändern. Diese Konformationsänderung ist vermutlich mitverantwortlich für die hohe intrinsische Sauerstoffaffinität und einen niedrigen alkalischen Bohreffekt des Hämoglobins. Phosphatfreies Hb Syracuse (His H21(143) β $\rightarrow$ Pro) zeigt im Vergleich zu Human HbA eine 10 mal höhere Sauerstoffaffinität und einen halb so großen alkalischen Bohreffekt^[48]. Pro in H21 β ändert die Konformation des C-Terminus.

Die Lage der B-Helix gegenüber der G-Helix wird in den β -Ketten von Human HbA durch eine Salzbrücke zwischen Glu B8(26) β und His G18(116) β stabilisiert. Ser G18(116) β bei *Chrysemys picta bellii* kann diese Salzbrücke nicht bilden.

In der Deoxyform von Human HbA findet man zwei Chloridbindungsstellen in Nachbarschaft zu Val NA1(1) α . Die α -Aminogruppe von Val 1 α tritt über ein Cl⁻-Anion in elektrostatische Wechselwirkung mit der Guanidiniumgruppe von Arg 141 α der anderen α -Kette und über ein zweites Cl⁻-Anion in elektrostatische Wechselwirkung mit der Hydroxylgruppe von Ser 131 α derselben α -Kette. Diese Chloridbindungen beeinflussen die Affinität von Val 1 α zu Protonen und damit den alkalischen Bohreffekt^[49]. In beiden α -Ketten der Hämoglobine von *Chrysemys picta bellii* findet man in 131 α Ala anstatt Ser. Infolge dessen sollten Chloridbindungseigenschaften und alkalischer Bohreffekt gegenüber Human HbA verändert sein. Unterschiedliche Bohreffekte von HbD und HbA bei *Chrysemys picta bellii* dürften unter anderem auf unterschiedliche pK-Werte der α -Aminogruppe von Met NA1(1) α einerseits und Val NA1(1) α andererseits zurückzuführen sein. Da der saure Bohreffekt von Human HbA im

Zusammenhang mit His H21(143) β steht^[44], sollte er bei *Chrysemys picta bellii* entweder reduziert sein, oder auf einem anderen Mechanismus beruhen, denn hier steht in Position H21(143) β Leu mit nicht ionisierbarer Seitenkette.

$\alpha 1-\beta 1$ Bindungsstellen					Deoxy-Hämoglobin		
Pos		α^{**}	α^A	α^D	β	β^{**}	
31	B12	Arg				Gln	H9 131
34	B15	Leu	Thr	Ala		Ala	H6 128
35	B16	Ser	Val	Val		Gln	H5 127
36	C1	Phe	Tyr	Tyr	Ala	Pro	H3 125
103	G10	His				Pro	H2 124
106	G13	Leu		Gln		Thr	H1 123
107	G14	Val				Phe	GH5 122
110	G17	Ala			Thr	Gly	GH2 119
111	G18	Ala	Ile	Val	Ser	His	G18 116
114	GH2	Pro		Ala		Ala	G17 115
117	GH5	Phe	Leu	Tyr	Jle	Cys	G14 112
118	H1	Thr				Asn	G10 108
119	H2	Pro			Leu	Met	D6 55
122	H5	His				Tyr	C1 35
123	H6	Ala	Val	Val		Val	B16 34
126	H9	Asp			Ile	Val	B15 33
						Arg	B12 30

$\alpha 1-\beta 2$ Bindungsstellen					Deoxy-Hämoglobin		
Pos		α^{**}	α^A	α^D	β	β^{**}	
37	C2	Pro				His	HC3 146
38	C3	Thr	Gln	Gln		Tyr	HC2 145
40	C5	Lys				Leu	G7 105
41	C6	Thr				Asn	G4 102
42	C7	Tyr				Glu	G3 101
44	CD2	Pro				Pro	G2 100
88	F9	Ala				Asp	G1 99
91	FG3	Leu				Val	FG5 98
92	FG4	Arg				His	FG4 97
94	G1	Asp			Ser	Glu	CD2 43
95	G2	Pro				Phe	C7 41
96	G3	Val				Arg	C6 40
97	G4	Asn				Trp	C3 37
140	HC2	Tyr				Pro	C2 36
141	HC3	Arg				Tyr	C1 35
						Val	B16 34

(** = Human)

Ham-Kontakte

Pos	α^{**}	α^A	α^D	β	β^{**}	
42	C7	Tyr			Phe	C7 41
43	CD1	Phe			Phe	CD1 42
45	CD3	His		Thr	Ser	CD3 44
46	CD4	Phe			Phe	CD4 45
58	E7	His			His	E7 63
61	E10	Lys			Lys	E10 66
62	E11	Val			Val	E11 67
65	E14	Ala		Ser	Ala	E14 70
66	E15	Leu			Phe	E15 71
80	F1	Leu			Phe	F1 85
83	F4	Leu			Leu	F4 88
86	F7	Leu	Ile		Leu	F7 91
87	F8	His			His	F8 92
91	FG3	Leu			Leu	FG3 96
93	FG5	Val			Val	FG5 98
97	G4	Asn			Asn	G4 102
98	G5	Phe			Phe	G5 103
101	G8	Leu			Leu	G8 106
132	H15	Val			Val	H15 137
136	H19	Leu			Leu	H19 141

(** = Human)

Im $\alpha 1$ - $\beta 1$ -Bindungsbereich findet man eine große Zahl von Substitutionen. Es ist fraglich inwieweit diese Austausche funktionelle Bedeutung haben, da die $\alpha 1$ - $\beta 1$ -Kontaktregion beim Übergang zwischen R- und T-Struktur nur relativ geringe Veränderungen erfährt. Die Einführung zusätzlicher polarer Gruppen (Thr B15(34), Tyr C1(36) in den α^A -Ketten; Tyr C1(36), Gln G13(106), Tyr GH5(117) in den α^D -Ketten und Thr GH2(119) in den β -Ketten) läßt an die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken denken.

Von den Aminosäuren, die den $\alpha 1$ - $\beta 2$ -Bindungsbereich formen ist in α^A -, α^D - und β -Ketten nur jeweils eine ausgetauscht. Besonders interessant erweist sich die Substitution Thr $\rightarrow$ Gln C3(38) in α^A - und α^D -Ketten. Gln an dieser Position findet man auch im Hämoglobin von Krokodilen^[50], Fischen^[51,52] und Vögeln^[53], sowie in allen bisher sequenzierten embryo-

nal en ζ -Ket ten^[6,54,84] und den π -Ket ten des Huhns^[85]. Allen hier genannten Hämoglobinen gemeinsam ist eine hohe intrinsische Sauerstoffaffinität. Beim Übergang von der Oxyform in die Deoxyform bewegt sich im Human HbA der FG-Bereich der β -Kette an der C-Helix der α -Kette entlang. His FG4(97) befindet sich entweder zwischen Pro CD2(44) α und Thr C6(41) α (T-Struktur) oder zwischen Thr C6(41) α und Thr C3(38) α (R-Struktur). Möglicherweise begünstigt Gln C3(38) α die R-Struktur. Ser CD2(43) β anstelle von Glu könnte ebenfalls Auswirkungen auf die Funktion haben. Im Human HbA besteht eine Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylgruppe von Glu CD2(43) β und der Guanidiniumgruppe von Arg FG4(92) α . Ser CD2(43) β kann nicht in gleicher Weise stabilisierend wirken.

In den α^D -Ket ten sind alle Häm-Kontakte erhalten. In den α^A -Ket ten ist Leu F7(86) α durch Ile ersetzt, das ebenfalls unpolar ist. Die beiden Substitutionen in den β -Ket ten sollten die Stabilität des Hämkomplexes nicht beeinträchtigen. Mit Thr CD3(44) β bleibt die Polarität gewahrt. Ser E14(70) β wird sehr häufig in β -Ket ten der verschiedensten Spezies gefunden^[55].

Des weiteren sind Substitutionen an den Berührungsstellen von B- und E-Helix in den α -Ket ten zu erwähnen. In den α^A -Ket ten sind dies Val B2(21) α und Leu E12(63) α , in den α^D -Ket ten Gln B2(21) α und Val E12(63) α . Im Modell des Human-Hämoglobins ist nicht genügend Raum für derart voluminöse Seitenketten. Die Raumstruktur der Hämoglobine von *Chrysemys picta bellii* sollte in diesem Bereich des Moleküls verändert sein. Ähnliche Verhältnisse wurden auch bei

Vogel-Hamoglobinen postuliert^[56].

In den Hamoglobinen von *Chrysemys picta bellii* befinden sich mehr polare Aminosäuren an der Moleküloberfläche als im adulten Humanhamoglobin HbA.

13. PHRYNOPS HILARII

Die brasilianische Süßwasserschildkröte *Phrynops hilarii* aus der Gattung der Krotenkopf-Schildkroten, Familie Schlangenhalschildkröten (Chelidae) gehört zur Unterordnung der Halswenderschildkroten (Pleurodira). Ihr Hamoglobin setzt sich aus zwei Komponenten C I und C II zusammen. Beide Komponenten neigen zur Polymerisation, die durch Reduktion mit DTE verhindert bzw. rückgängig gemacht werden kann. C II bildet Oktamere, C I möglicherweise Dodekamere. Andererseits besteht eine erhöhte Tendenz zur Dissoziation in Dimere und Monomere bei Verdünnung der Lösungen^[4,57].

Für die Polymerisation von Hamoglobinen über Disulfidbrücken sind Cysteinreste an der Oberfläche des Moleküls verantwortlich (z.B. Cys F6(90) β in Hb Porto Alegre^[58]). Die α^D -Ketten der Komponente C II haben ein externes Cys in F2(81) das für die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken in Frage kommt.

Die Instabilität von Hämoglobinen beruht häufig auf Substitutionen der α - β -Bindungsstellen. Von 16 $\alpha 1$ - $\beta 1$ Bindungsstellen sind in den α^D -Ketten von *Phrynops hilarii* 9 gegenüber Humanhamoglobin verändert. Zwei $\alpha 1$ - $\beta 2$ Bindungsstellen sind ausgetauscht: Gln C3(38) ist typisch für α^D -Ketten (zu

möglichen funktionellen Auswirkungen siehe *Chrysemys picta bellii*); His CD2(44) wird selten gefunden (z.B. beim Meer-schweinchen^[59]). Es ist fraglich ob die Instabilität der Tetrameren damit erklärt werden kann.

Deoxy-Hämoglobin

$\alpha 1-\beta 1$ Bindungsstellen				$\alpha 1-\beta 2$ Bindungsstellen			
Pos		α^{**}	α^D	Pos		α^{**}	α^D
31	B12	Arg	:	37	C2	Pro	
34	B15	Leu	Thr	:	38	C3	Thr
35	B16	Ser	Val	:	40	C5	Lys
36	C1	Phe	Tyr	:	41	C6	Thr
103	G10	His	:	42	C7	Tyr	
106	G13	Leu	His	:	44	CD2	Pro
107	G14	Val	:	88	F9	Ala	His
110	G17	Ala	:	91	FG3	Leu	
111	G18	Ala	Gly	:	92	FG4	Arg
114	GH2	Pro	Gly	:	94	G1	Asp
117	GH5	Phe	Tyr	:	95	G2	Pro
118	H1	Thr	Ser	:	96	G3	Val
119	H2	Pro	:	97	G4	Asn	
122	H5	His	:	140	HC2	Tyr	
123	H6	Ala	Val	:	141	HC3	Arg
126	H9	Asp	:				

(** = Human)

Wie in den α^D -Ketten von *Chrysemys picta bellii* sind bei *Phrynosoma marmoratum* die Hämkontakte erhalten.

Auf die sterischen Auswirkungen von Gln B2(21) α und Val E12(63) α wurde bei *Chrysemys picta bellii* eingegangen, ebenso auf die mögliche Bedeutung von Ala H14(131) α für den alkalischen Bohreffekt.

14. IGUANA IGUANA

Der grüne Leguan (*Iguana iguana*) aus der Familie Iguanidae, Zwischenordnung Gekkota, Unterordnung Sauria zählt zur Ordnung der Squamata (eigentliche Schuppenkriechtiere). Er

kommt in Wäldern von Mexiko bis Mittelbrasilien vor. Er hält sich gern auf Bäumen auf und bevorzugt die Nähe von Gewässern. Bei Gefahr fluchtet er ins Wasser und bleibt dort bis zu 4 1/2 Stunden untergetaucht, ohne Luft zu holen^[60]. Die Körpertemperatur kann dabei von 40,4°C auf 26°C absinken. Verschiedene Adaptionsmechanismen, wie Senkung der Herzfrequenz, Einschränkung der körperlichen Aktivität, anaerobe Energiebereitstellung, lassen das Tier so lange Perioden der Hypoxie überstehen. Hämoglobin mit geringer Sauerstoffaffinität gewährleistet wahrscheinlich die Aufrechterhaltung eines hohen Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe und bietet damit die Möglichkeit Sauerstoff im Gewebe zu speichern. Der Halbsättigungswert des Blutes für Sauerstoff beträgt $P_{50} = 51 \text{ mmHg}$ (35°C; pH 7,4), der Bohrfaktor $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0,52$ ist nicht temperaturabhängig^[61]. Werte für phosphatfreies Hamolysat oder für Lösungen isolierter Hämoglobinkomponenten sind nicht bekannt, es darf jedoch eine niedrige intrinsische Sauerstoffaffinität angenommen werden.

Guttman^[62] fand bei elektrophoretischen Untersuchungen des Hämoglobins des Grünen Leguans nur eine Hämoglobinkomponente. Bei anderen Vertretern aus der Familie der Iguanidae konnte er einen starken Polymorphismus nachweisen. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Grüne Leguan zeigt mehrere Hämoglobinkomponenten von geringer Stabilität, wie aus den diffusen Banden der Diskelektrophorese und aus dem komplexen Bild der Komponententrennungen an Ionenaustauschern hervorgeht.

Die räumliche Struktur der α -Ketten des Human HbA wird unter

anderem durch Salzbrücken zwischen His B1(20) α und Glu B4(23) α sowie zwischen Glu B11(30) α und His CD8(50) α stabilisiert. Beide Bindungen können beim Grünen Leguan nicht ausgebildet werden. Man findet Asn B1(20) α , Ala B4(23) α , Thr B11(30) α und Gln CD8(50) α , also jeweils neutrale Aminosäuren. Auch in den β -Ketten können zwei der Salzbrücken, die man im Human HbA vorfindet, nicht gebildet werden. Es sind die zwischen Asp B3(21) β und Lys E5(61) β sowie zwischen Glu B8(26) β und His G18(116) β . Beim Leguan findet man Ala B3(21) β und Ala G18(116) β .

In der zentralen Kavität sowohl zwischen den α -Ketten als auch zwischen den β -Ketten müßte beim Grünen Leguan mehr positive Ladung vorliegen als beim Human HbA. Zwar ist bei Iguana iguana Lys G6(99) α durch Gly ersetzt, doch wird dieser Verlust an Ladung durch die Substitutionen Ser H14(131) α $\rightarrow$ Lys und Thr H17(134) α $\rightarrow$ Lys mehr als kompensiert. In den β -Ketten ist His H21(143) β durch Arg und Asn H17(139) β durch His ersetzt.

Erhöhung der positiven Nettoladung im Spalt zwischen den β -Ketten bewirkt beim Human-Hämoglobin eine erhöhte intrinsische Sauerstoffaffinität einerseits, eine größere Sensibilität gegenüber organischen Phosphaten andererseits.

Es ist von menschlichen abnormalen Hämoglobinen bekannt, daß der Austausch von unpolaren Aminosäuren, dort wo die Seitenketten ins Molekülinnere ragen, gegen polare oder geladene Aminosäuren die Stabilität des Moleküls verringert. In den β -Ketten bei Iguana iguana finden sich mehrere solcher Substitutionen: Cys G14(112) β $\rightarrow$ Thr, Val G15(113) β $\rightarrow$ Arg, Val H12(134) β $\rightarrow$ Thr.

Die Substitutionen an den $\alpha 1\text{-}\beta 1$ - und den $\alpha 1\text{-}\beta 2$ -Bindungsstellen sowie an den Häm-Kontakten sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

$\alpha 1\text{-}\beta 1$ Bindungsstellen Deoxy-Hämoglobin

Pos	α^{**}	α	β	β^{**}	
31	B12	Arg		Gln	H9 131
34	B15	Leu		Ala	H6 128
35	B16	Ser	His	Gln	H5 127
36	C1	Phe	Ala	Pro	H3 125
103	G10	His		Pro	H2 124
106	G13	Leu		Thr	H1 123
107	G14	Val		Phe	GH5 122
110	G17	Ala		Gly	GH2 119
111	G18	Ala	Ala	His	G18 116
114	GH2	Pro	His	Ala	G17 115
117	GH5	Phe	Thr	Cys	G14 112
118	H1	Thr		Asn	G10 108
119	H2	Pro	Cys	Met	D6 55
122	H5	His		Tyr	C1 35
123	H6	Ala		Val	B16 34
126	H9	Asp		Val	B15 33
			Cys	Arg	B12 30

$\alpha 1\text{-}\beta 2$ Bindungsstellen Deoxy-Hämoglobin

Pos	α^{**}	α	β	β^{**}	
37	C2	Pro		His	HC3 146
38	C3	Thr		Tyr	HC2 145
40	C5	Lys		Leu	G7 105
41	C6	Thr		Asn	G4 102
42	C7	Tyr	Val	Glu	G3 101
44	CD2	Pro		Pro	G2 100
88	F9	Ala		Asp	G1 99
91	FG3	Leu		Val	FG5 98
92	FG4	Arg		His	FG4 97
94	G1	Asp	Pro	Glu	CD2 43
95	G2	Pro		Phe	C7 41
96	G3	Val		Arg	C6 40
97	G4	Asn		Trp	C3 37
140	HC2	Tyr		Pro	C2 36
141	HC3	Arg		Tyr	C1 35
				Val	B16 34

(** = Human)

Häm-Kontakte (** = Human)

Pos	α^{**}	α	β	β^{**}	
42	C7	Tyr		Phe	C7 41
43	CD1	Phe		Phe	CD1 42
45	CD3	His	Asp	Ser	CD3 44
46	CD4	Phe		Phe	CD4 45
58	E7	His		His	E7 63
61	E10	Lys		Lys	E10 66
62	E11	Val		Val	E11 67
65	E14	Ala	Ser	Ala	E14 70
66	E15	Leu		Phe	E15 71
80	F1	Leu		Phe	F1 85
83	F4	Leu		Leu	F4 88
86	F7	Leu		Leu	F7 91
87	F8	His		His	F8 92
91	FG3	Leu		Leu	FG3 96
93	FG5	Val		Val	FG5 98
97	G4	Asn		Asn	G4 102
98	G5	Phe		Phe	G5 103
101	G8	Leu		Leu	G8 106
132	H15	Val		Val	H15 137
136	H19	Leu		Leu	H19 141

Auffällig ist die große Zahl der Substitutionen an $\alpha 1$ - $\beta 1$ Bindungsstellen, häufig unter Polaritätsänderung, so daß andere Wasserstoffbrücken als im Humanhämoglobin zur Stabilität der Dimeren beitragen werden. Die Frage nach der funktionellen Bedeutung muß wie bei *Chrysemys picta bellii* offen bleiben.

Besondere Erwähnung verdient der Austausch His H5(122) α $\rightarrow$ Ala. Zwei Wasserstoffbrücken können nicht mehr gebildet werden. Außerdem trägt His H5(122) α im Humanhämoglobin wesentlich zum alkalischen Bohr-Effekt bei^[63], die Substitution verändert das Protonenbindungsverhalten. In den meisten Hämoglobinen findet man in Position G3(101) β Glu. Austausche dieses Restes im $\alpha 1$ - $\beta 2$ -Bindungsbereich führen bei abnormalen Humanhämoglobinen zu geänderten Sauerstoff-Bindungseigenschaften. So hat Hb Rush (Glu $\rightarrow$ Gln)^[64] eine höhere Sauerstoffaffinität und eine geringere Stabilität als

Human HbA. Der Ersatz von Glu G3(101) β durch Val bei Iguana iguana sollte also ebenfalls funktionelle Bedeutung haben. In der Deoxyform des Human HbA bildet die Hydroxylgruppe von Thr C3(38) α 1 über ein Solvensmolekül eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylgruppe von Asp G1(99) β 2. Ala C3(38) α bei Iguana iguana kann diese Bindung nicht eingehen. Im Human HbA findet sich zwischen Arg FG4(92) α 1 und Glu CD2(43) β 2 eine Salzbrücke. Pro CD2(43) β beim Leguan ändert diese Bindungsverhältnisse.

In den α -Ketten sind alle Hämkontakte erhalten. In den β -Ketten sind zwei Hämkontakte gegenüber Human HbA verändert. Ser E14(70) β wird sehr häufig gefunden. Asp CD3(44) β wurde bisher in keinen komplett sequenzierten β -Ketten gefunden. Die Teilsequenzen von Uromastix hardwickii β -Ketten weisen den gleichen Austausch auf^[65]. Asp könnte nach persönlicher Mitteilung von Prof. Perutz eine Salzbindung mit Lys E3(59) β eingehen.

In Position H5(122) α hat Iguana iguana Alanin, während His an dieser Position beim Human HbA für einen großen Teil des alkalischen Bohr-Effekts verantwortlich ist^[63]. His H21(143) β bei Human HbA hat Anteil am phosphatabhängigen alkalischen Bohr-Effekt^[44]. Bei Iguana iguana ist H21(143) β mit Arg besetzt. Wenn das Hämoglobin von Iguana iguana keinen verringerten Bohr-Effekt zeigt, dann müssen hier andere Gruppen daran beteiligt sein.

Sinet et al.^[66] erklärten die Temperatur-Unabhängigkeit des alkalischen Bohr-Effekts beim Hämoglobin des Schweins mit der Substitution von Ser H14(131) α $\rightarrow$ Gln. Sie nehmen an, daß durch die Nachbarschaft von Gln H14(131) α der pK-Wert von

Val NA1(1) α in der Deoxyform gesenkt und infolge dessen die oxygenierungs-abhängige Chlorid-Bindung zwischen α 1- und α 2-Ketten verhindert wird. Lys H14(131) α bei *Iguana iguana* sollte den pK-Wert von Val NA1(1) α noch weiter senken und damit ebenfalls der erwähnten Chlorid-Bindung entgegenwirken. Tatsächlich beobachteten Wood et al.^[61] bei *Iguana iguana* einen alkalischen Bohr-Effekt der nicht temperaturabhängig ist.

Mit Ausnahme von NA2(2) β , wo bei *Iguana iguana* His anstelle von Glu oder Asp gefunden wird, sind alle anderen ATP--Bindungsstellen vorhanden: Val NA1(1) β , Asp EF3(79) β , Lys EF6(82) β und Arg H21(143) β . Von Perutz et al.^[37] wurde erwogen, daß auch His NA2(2) β als Wasserstoffakceptor eine Wasserstoffbrücke zu einer NH₂-Gruppe des Adenins bilden könnte. Folglich sollte ATP als allosterischer Effektor die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins von *Iguana iguana*, das die sequenzierten β -Ketten enthält, senken.

15. Allosterische Kontrolle der Sauerstoffaffinität

Die Sauerstoffaffinität der meisten Hämoglobine wird unter dem Einfluß heterotroper allosterischer Effektoren abgesenkt, eine Eigenschaft die der Kontrolle des Sauerstofftransports dient. Im allgemeinen erfüllen Polyphosphate diese Aufgabe, indem sie die niedriger affine T-Struktur stabilisieren: ATP und GTP bei Fischen und Amphibien, IPP bei Vögeln und 2,3-DPG bei Säugern. Bei den Krokodilen wurde die direkte allosterische Wechselwirkung von O₂ und CO₂ in

Form von Bicarbonationen gefunden^[67,68]. Dieser einfache Kontrollmechanismus wurde auch für andere Reptilien postuliert. Nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die vorgeschlagenen Bindungsstellen organischer Polyphosphate^[35,36,37] und des Bicarbonats^[67]. Die entsprechenden Positionen auf den β -Globinketten von *Chrysemys picta bellii* und *Iguana iguana* sind aufgeführt.

Bindungsstellen heterotroper allosterischer Effektoren:

	NA1	NA2	EF6	H13	H17	H21	H22
Effektor	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 82$	$\beta 135$	$\beta 139$	$\beta 143$	$\beta 144$

HCO ₃	Ac-Ala	-	Lys	-	-	-	Glu
2,3-DPG	Val	His	Lys	-	-	His	-
IPP	Val	His	Lys	Arg	His	Arg	-
ATP,GTP	Val	Glu	Lys	-	-	Arg	-

Chrys.p.b.	Val	His	Lys	Ser	His	Leu	Gly
Iguana	Val	His	Lys	Gly	His	Arg	Arg

Die Daten zeigen, daß weder die β -Ketten von *Chrysemys picta bellii* noch die von *Iguana iguana* Bicarbonat in der bei den Crocodylia gefundenen Weise binden können. Auch die bislang bekannten partiellen Sequenzen anderer Reptilienglobine schließen eindeutig den O₂-CO₂ Mechanismus aus (siehe S. 128). Weitgehend entsprechen die gefundenen Bindungsstellen den bisher vorgeschlagenen für organische Polyphos-

phate. Vieles spricht dafür, daß ATP bei den meisten Reptilien die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins reguliert. Die Kontrolle des Sauerstofftransports bei den Crocodylia bleibt weiterhin ein im Bereich der Wirbeltiere einzigartiges Phänomen ungeklärten Ursprungs.

16. DIE α^D -KETTEN

Vergleicht man die α -Ketten der Hämoglobinnebenkomponente von *Chrysemys picta bellii* und die der Hämoglobinkomponente C II von *Phrynosoma hillarii* mit α -Ketten von Hämoglobinen anderer Tiere (Reptilien, Vögel, Säuger), so fällt auf, daß sie den α^D -Ketten der Vögel am nächsten stehen. Die Zahl der Aminosäureaustausche und die der minimalen Nucleotidaustausche liegt in der gleichen Größenordnung wie bei phylogenetisch sehr entfernten Säugern. Dieser Befund, sowie viele gemeinsame Aminosäuren, die an den entsprechenden Positionen ausschließlich in den α^D -Ketten bei Vögeln und in den oben erwähnten α -Ketten bei *Chrysemys picta bellii* und *Phrynosoma hillarii* gefunden wurden, gaben Anlaß diese α -Ketten in der vorliegenden Arbeit dem α^D -Typ zuzuordnen. Die α -Ketten der Hämoglobinhauptkomponente von *Chrysemys picta bellii* zeigen beim Vergleich mit anderen Hämoglobinen die größte Homologie zu den α^A -Ketten der Vogelhamoglobine und werden in Analogie dem α^A -Typ zugerechnet.

16.1 Strukturmerkmale der α^D -Ketten

In Tabelle 7 sind alle bisher veröffentlichten Primärstrukturen von α^D -Ketten zusammengefaßt.

Tab. 7

				5		10		15		20		25		30
HACP2	M	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
HAPH2	N	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
HAFEDR	N	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
HUHN	N	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
STRAUSS	N	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
NANDU	N	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
STAR	N	N	N	D	E	L	I	K	H	A	W	E	K	V
				35		40		45		50		55		60
HACP2	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
HAPH2	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
HAFEDR	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
HUHN	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
STRAUSS	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
NANDU	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
STAR	F	H	F	A	V	T	P	Q	T	T	T	T	T	T
				65		70		75		80		85		90
HACP2	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
HAPH2	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
HAFEDR	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
HUHN	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
STRAUSS	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
NANDU	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
STAR	K	V	V	T	A	G	D	A	V	H	N	D	N	L
				95		100		105		110		115		120
HACP2	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
HAPH2	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
HAFEDR	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
HUHN	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
STRAUSS	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
NANDU	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
STAR	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	Q	C
				125		130		135		140				
HACP2	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A
HAPH2	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A
HAFEDR	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A
HUHN	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A
STRAUSS	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A
NANDU	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A
STAR	V	H	V	A	Y	D	K	F	L	A	A	V	S	A

HACP2 = *Chrysomys picta bellii*; HAPH2 = *Phrynosoma hilarii*;
HAFEDR = *Phasianus colchicus colchicus*; Huhn = *Gallus gallus*;
Strauss = *Struthio camelus*; Nandu = *Rhea americana*;
Star = *Sturnus vulgaris*

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über charakteristische Gemeinsamkeiten aller bisher sequenzierten α^D -Ketten:

Pos.

9	A 7	Leu	In den meisten α -Ketten polar oder geladen (Asn, His, Glu, Arg)		
24	B 5	Phe/Ile	Sonst meist Tyr		
53	E 2	Asp/Glu	"	"	Ala
71	E20	basisch	"	"	neutral (Ala, Gly, Asn) oder sauer (Asp, Glu)
75	EF 4	Asn	"	"	Asp
77	EF 6	Ser	"	"	Ala oder Pro
89	FG 1	Tyr	"	"	His oder Gln
90	FG 2	Asn	"	"	Lys
106	G13	Gln/His	"	"	Leu
113	GH 1	Leu/Met	"	oft	His
114	GH 2	Gly/Ala	"	meist	Pro
115	GH 3	geladen	"	"	neutral
117	GH 5	Tyr	"	"	Phe oder Leu
124	H 7	Ala	"	"	Ser
125	H 8	Tyr/Phe	"	"	Leu oder Met
137	H20	Ala	"	"	Thr
138	H21	Glu	"	"	Ser oder Ala

16.2 Verbreitung von α^D -Genen

Die Expression des α^D -Gens wurde bisher nur bei Vögeln beschrieben, die meist 2 adulte Hämoglobine (Hb A und Hb D) mit identischen β -Ketten aber unterschiedlichen α^A - und α^D -Ketten haben^[53,69,70]. Die α^A -Ketten entsprechen den "normalen" α -Ketten. α^A - und α^D -Ketten unterscheiden sich voneinander in ca. 50 Resten.

Die α -Ketten aller bislang untersuchten Hämoglobine der Crocodylia^[50] weisen untereinander große Homologie auf und ähneln den α^A -Ketten von *Chrysemys picta bellii* und denen der Vögel.

Die Untersuchungen am Hämoglobin des Grünen Leguans (*Iguana iguana*) lieferten keinen Hinweis auf die Existenz eines α^D -Globingens bei diesen Tieren. Die dort gebildeten α -Ketten ähneln denen des Warans (*Varanus griseus*)^[71] und der Eidechse (*Uromastix hardwickii*)^[65], zeigen jedoch nur geringe Homologie sowohl zu α^A -Ketten als auch zu α^D -Ketten. Auch alle bekannten α -Ketten der Schlangen-Hämoglobine^[72,73] können aufgrund signifikanter Unterschiede nicht dem α^D -Typ zugeordnet werden.

Die Ähnlichkeit der α^D -Ketten von Schildkröten mit denen der Vögel berechtigt zur Annahme, daß die Genduplikation, die zur Entstehung von α^A - und α^D -Genen führte, älter ist als die Trennung der Vögel von Reptilien (280×10^6 Jahre). Der Befund läßt die Frage offen, warum das α^D -Gen nur bei Schildkröten und Vögeln, nicht aber bei anderen Reptilien gefunden wird. Wenn das α^D -Gen bei anderen Reptilien nicht

vorhanden ist, könnten die vorliegenden Ergebnisse evtl. Indiz sein für eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zwischen Schildkröten und Vögeln.

16.3 α^D -Ketten, eine Persistenz embryonaler Gene?

α^D -Ketten wurden erstmals beim Hämoglobin D des adulten Huhns nachgewiesen und proteinanalytisch untersucht^[69]. Später fanden Chapman et al., daß frühembryonales Hb M des Huhnes Globinketten vom α^D -Typ enthält. 65 % dieser Aminosäuresequenz wurden aufgeklärt^[74]. Seitdem mit gentechnologischen Methoden gezeigt werden konnte, daß im Globingenom des Huhns neben π - und α^A -Gen nur ein α^D -Gen vorliegt, dessen Sequenz mit der partiellen Aminosäuresequenz des embryonalen α^D -Globins übereinstimmt^[75,76,77]. folgert man, daß adulte und embryonale α^D -Ketten identisch sind. Die Anordnung der α -Globingene im Genom der Ente entspricht derjenigen des Huhns mit nur einem α^D -Gen^[78,79]. Mittlerweile kennt man mehrere Sequenzen von α^D -Ketten adulter Hämoglobine verschiedener Vogelspezies^[53] (siehe Tab. 7). Es ist erstaunlich, daß das embryonale α^D -Gen in manchen (nicht alle Vogelarten bilden Hb D) adulten Vögeln weiter exprimiert wird. Zur Zeit ist unklar ob daraus gewisse adaptive Vorteile erwachsen. Überraschenderweise wurden im Hämoglobin adulter Schildkröten α^D -Ketten vorgefunden. Daher stellt sich die Frage, ob das α^D -Gen auch in embryonalen Schildkröten exprimiert wird. Bekanntlich bilden auch Schildkroten spezifische embryonale Hämoglobine^[80,81,82]. Es ist nicht geklärt, warum nur bei Schildkröten und manchen

Vögeln α^D -Ketten gefunden werden, nicht aber bei anderen Reptilien und den Säugern. Es bedarf weiterer Untersuchungen um folgende Fragen zu beantworten: Haben die Spezies, welche im adulten Individuum keine α^D -verwandten Globinketten produzieren, α^D -verwandte Gene und wenn ja, werden diese in einem präadulten Stadium exprimiert? Im gleichen Zusammenhang scheint es erwähnenswert, daß zwischen embryonalen ξ -Ketten des Menschen^[6,84] und α^D -Ketten eine erstaunlich große Verwandtschaft besteht^[83]. Die Klärung dieser Fragen wird interessante Aspekte zu den Problemen der Duplikation, der Expression und Repression sowie der Evolution der Gene liefern.

17. EVOLUTION

Reptilien werden mit Säugern und Vögeln als Amnioten zusammengefaßt. Man geht davon aus, daß sich aus Amphibien primitive sogenannte Stammreptilien entwickelt haben, die als gemeinsame Vorfahren aller Amnioten gelten. Was die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Amnioten anbetrifft ist man auf Fossildaten und die Erkenntnisse der vergleichenden Morphologie angewiesen. Verschiedene Gewichtung gemeinsamer Merkmale führte dabei zu sehr voneinander abweichenden Vorstellungen von der Evolution der betreffenden Arten.

So wird häufig eine Einteilung, beruhend auf einem unterschiedlichen Bau des Schädeldaches vorgenommen^[86,87]. Danach gehören Schildkröten und die Stammreptilien zum anapsiden Typ (keine Schläfenöffnung), Säuger und säuger-

ähnliche Reptilien zum synapsiden Typ (eine Schläfenöffnung), Rynchocephalia und Archosauria zum diapsiden Typ (zwei Schläfenöffnungen). Zu den Archosauriern gehören die Krokodile und die Vorfahren der heutigen Vögel. Die Eidechsen und Schlangen stammen nach dieser Klassifizierung von diapsiden Vorfahren ab.

Die Schildkröten wären danach die stammesgeschichtlich ältesten Reptilien. Erst später wären die zu den Säugern führenden Reptilien abgezweigt, und der verbleibende Ast hätte noch später eine Aufspaltung in Rynchocephalia (heutiger Vertreter: Sphenodon), Archosauria (heutige Vertreter: Krokodile, Vögel) und die Vorläufer der Squamata (heutige Vertreter: Eidechsen, Schlangen) erfahren.

Fossilienfunde von frühzeitlichen Schildkröten datieren möglicherweise ins Perm. Im mittleren und späten Abschnitt der Triasperiode lebten die ersten echten Schildkröten. Während des Mesozoikums fand die Aufspaltung in Pleurodiren und Cryptodiren statt. Fossilien der vermutlichen Vorfahren der Squamata existieren ebenfalls aus der Zeit des Trias.

Aufgrund verschiedener neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der vergleichenden Morphologie und der Molekularbiologie gelangt Lovtrup^[88] zu einem anderen Bild der Entstehungsgeschichte der Amnioten. Bei ihm nehmen Schildkröten eine Nachbarstellung zu Vögeln und Krokodilen ein. Die Squamata sind danach stammesgeschichtlich älteren Ursprungs. Gardiner geht noch weiter, indem er die Säuger neben den Vögeln mit den Krokodilen und den Schildkröten in einer Gruppe zusammenfaßt^[39].

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen homologer Proteine

kann zum Erkennen von Verwandtschaftsbeziehungen der sie codierenden Gene und damit auch der verschiedenen Tierarten beitragen.

In den folgenden Tabellen 8 a. und 8 b. sind α - bzw. β -Ketten von *Chrysemys picta bellii*, *Phrynosoma hylarii* und *Iguana iguana* einigen ausgewählten α - bzw. β - Ketten anderer Vertebratenhamoglobine gegenübergestellt. Mit einem Sequence Alignment Program^[92] basierend auf der "genetic code matrix" wurden die Unterschiede zwischen den Globinketten ermittelt. Die Resultate sind in den Tabellen 9 a. und 9 b. wiedergegeben.

Abkürzungen:

HACP1 = Hämoglobin	α_D	α -Ketten Zierschildkröte (<i>Chrysemys picta bellii</i>)
HACP2 = "	α_D	" " " " " " " "
HBCP = "	β_D	" " " " " " " "
HAPH2 = "	α_A	Krötenkopfschildkröte (<i>Phrynosoma hylarii</i>)
HAFa = "	α_D	Fasan (<i>Phasianus colchicus colchicus</i>)
HAFEDR = "	α_D	" " " " " " " "
HBFA = "	β	" " " " " " " "
HAHU = "	α	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)
HBHU = "	β	" " " " " " " "
HAIG = "	α	Grüner Leguan (<i>Iguana iguana</i>)
HBIG = "	β	" " " " " " " "
HAAK = "	α	Nilkrokodil (<i>Crocodylus niloticus</i>)
HBAK = "	β	" " " " " " " "
HASN V = "	α	Viper (<i>Vipera aspis</i>)
HATG = "	α_1	Ameisenigel (<i>Tachyglossus aculeatus</i>)
HATG2 = "	α_2	" " " " " " " "
HBTG = "	β	" " " " " " " "
HAOR = "	α	Schnabeltier (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)
HBOR = "	β	" " " " " " " "
HBCAA = "	β	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)

Austausche in den alpha-Typ Ketten:

	HACP2	HAPH2	HAFEDR	HACP1	HAPA	HAHU	HAAR	HASN V	HAIG	HATG	HATG2	HAOR
HACP2	-	23	39	51	58	55	55	73	72	64	62	59
HAPH2	27	-	42	53	58	55	56	70	69	65	62	60
HAFEDR	45	48	-	56	57	57	55	69	72	66	66	57
HACP1	58	71	73	-	36	47	36	65	66	57	58	52
HAPA	77	79	73	43	-	40	32	59	61	50	52	49
HAHU	73	75	71	61	50	-	44	50	61	37	41	39
HAAR	74	77	74	44	39	59	-	62	64	56	55	49
HASN V	107	97	93	37	79	74	88	-	66	66	67	63
HAIG	107	97	93	38	77	79	86	93	-	67	68	61
HATG	81	92	89	72	62	45	75	88	90	-	9	16
HATG2	84	89	86	74	64	50	74	89	90	9	-	22
HAOR	80	85	78	65	61	47	68	85	83	19	25	-

Austausche in den beta-Typ Ketten:

	HBOR	HBIG	HAPA	HBHU	HBAK	HBTG	HBOR	HBCAA
HBOR	-	40	71	50	50	46	46	69
HBIG	51	-	77	50	60	49	50	73
HAPA	27	45	-	47	53	42	42	64
HBHU	38	26	61	-	66	31	34	66
HBAK	72	85	70	41	-	67	65	83
HBTG	40	47	75	42	93	-	14	72
HBOR	44	47	70	44	90	15	-	69
HBCAA	76	107	87	90	126	97	91	-

Die Zahlen über der Diagonalen geben die Zahl der Amino-saureaustausche wieder, die unter der Diagonalen die Anzahl der minimalen Nucleotidaustausche.

Betrachtet man die α -Ketten des Hämoglobins von Amnioten, so fällt eine bemerkenswert große Homologie auf zwischen den α^A -Ketten bei *Chrysemys picta bellii* und den α^A -Ketten bei den Vögeln (Fasan) (36 Unterschiede). Um den gleichen Betrag (36) unterscheiden sich die α^A -Ketten bei *Chrysemys picta bellii* von den α -Ketten beim Nilkrokodil. Zwischen α^A -Ketten beim Fasan und α -Ketten beim Nilkrokodil besteht eine etwas größere Ähnlichkeit (32 Unterschiede). Zu den α -Ketten beim Grünen Leguan bestehen jeweils wesentlich größere Unterschiede (über 61). Diese Ergebnisse und das Vorhandensein von α^D -Ketten sowohl bei Schildkröten als auch bei Vögeln lassen in guter Übereinstimmung zu Lovtrup vermuten, daß Schildkröten phylogenetisch den Vögeln und Crocodylia naher stehen und Eidechsen entstellungsgeschichtlich älter sind, als es aus der phylogenetischen Klassifikation nach Romer hervorgeht. Weiters sieht man eine sehr große Differenz der Sequenzen von Viper und Leguan, möglicherweise ein Hinweis auf eine sehr frühe Trennung von Eidechsen und Schlangen.

Bei den β -Ketten ergibt sich ein weniger klares Bild. Zwar wiederholt sich auch hier die große Übereinstimmung beim Vergleich von *Chrysemys picta bellii* mit den Vögeln - nur 31 Unterschiede zum Fasan liegen in der gleichen Größenordnung wie sie beim Vergleich stammesgeschichtlich älter Säugetiere gefunden wird - doch die Unterschiede zu den β -Ketten der Crocodylia sind wesentlich größer als beim Vergleich der α -Ketten. Das überrascht nicht, weil das Hämoglobin der Crocodylia funktionell stark von anderen Hämoglobinen abweicht, und hier sind es insbesondere die β -Ketten der

Crocodylia-Hämoglobine, welche Bicarbonationen als allosterische Effektoren binden können.

Die β -Ketten beim Grünen Leguan sind hingegen den β -Ketten bei *Chrysemys picta bellii* und bei den Vögeln ähnlicher als die entsprechenden α -Ketten. Zur Erklärung dieser Diskrepanzen kann man unterschiedliche Mutationsraten von α -Ketten und β -Ketten annehmen; es ist aber auch möglich, daß man Gene vergleicht, deren Verwandtschaftsbeziehungen infolge von Genduplikationen, Genkonversionen und Gendeletionen nicht mehr die Verwandtschaftsverhältnisse der Tiere widerspiegeln.

Zusammenstellung aller bisher bekannten Hb-Sequenzen der Reptilia: α -Ketten:

	5	10	15	20	25	30
HACF2	M	L	N	H	D	S
HAPH2	M	L	N	H	D	S
HACF1	M	L	N	H	D	S
HAIG	M	L	N	H	D	S
HAVA	M	L	N	H	D	S
HAUH.1	M	L	N	H	D	S
HAUH.2	M	L	N	H	D	S
HAAK	M	L	N	H	D	S
HAAQ	M	L	N	H	D	S
HACQ	M	L	N	H	D	S
HASN V	M	L	N	H	D	S
HABN	M	L	N	H	D	S
HAPY	M	L	N	H	D	S
HAIN	M	L	N	H	D	S
	35	40	45	50	55	60
HACF2	R	M	F	F	F	F
HAPH2	R	M	F	F	F	F
HACF1	R	M	F	F	F	F
HAIG	R	M	F	F	F	F
HAVA	R	M	F	F	F	F
HAUH.1	R	M	F	F	F	F
HAUH.2	R	M	F	F	F	F
HAAK	R	M	F	F	F	F
HAAQ	R	M	F	F	F	F
HACQ	R	M	F	F	F	F
HASN V	R	M	F	F	F	F
HABN	R	M	F	F	F	F
HAPY	R	M	F	F	F	F
HAIN	R	M	F	F	F	F
	65	70	75	80	85	90
HACF2	K	V	V	T	A	L
HAPH2	K	V	V	T	A	L
HACF1	K	V	V	T	A	L
HAIG	K	V	V	T	A	L
HAVA	K	V	V	T	A	L
HAUH.1	K	V	V	T	A	L
HAUH.2	K	V	V	T	A	L
HAAK	K	V	V	T	A	L
HAAQ	K	V	V	T	A	L
HACQ	K	V	V	T	A	L
HASN V	K	V	V	T	A	L
HABN	K	V	V	T	A	L
HAPY	K	V	V	T	A	L
HAIN	K	V	V	T	A	L
	95	100	105	110	115	120
HACF2	L	R	V	D	P	V
HAPH2	L	R	V	D	P	V
HACF1	L	R	V	D	P	V
HAIG	L	R	V	D	P	V
HAVA	L	R	V	D	P	V
HAUH.1	L	R	V	D	P	V
HAUH.2	L	R	V	D	P	V
HAAK	L	R	V	D	P	V
HAAQ	L	R	V	D	P	V
HACQ	L	R	V	D	P	V
HASN V	L	R	V	D	P	V
HABN	L	R	V	D	P	V
HAPY	L	R	V	D	P	V
HAIN	L	R	V	D	P	V
	125	130	135	140		
HACF2	V	H	V	A	Y	D
HAPH2	V	H	V	A	Y	D
HACF1	V	H	V	A	Y	D
HAIG	V	H	V	A	Y	D
HAVA	V	H	V	A	Y	D
HAUH.1	V	H	V	A	Y	D
HAUH.2	V	H	V	A	Y	D
HAAK	V	H	V	A	Y	D
HAAQ	V	H	V	A	Y	D
HACQ	V	H	V	A	Y	D
HASN V	V	H	V	A	Y	D
HABN	V	H	V	A	Y	D
HAPY	V	H	V	A	Y	D
HAIN	V	H	V	A	Y	D

Abkürzungen:

HACP1	-	Hamoglobin	α^A	-	Ketten	Zierschildkröte (<i>Chrysemys picta bellii</i>)
HACP2	-	"	α^D	-	"	" " " " " "
HBCP	-	"	β	-	"	" " " " " "
HAPH2	-	"	α^D	-	"	Krotenkopfschildkröte (<i>Phrynos hylarii</i>)
HAIG	-	"	α	-	"	Grüner Leguan (<i>Iguana iguana</i>)
HBIG	-	"	β	-	"	" " " " " "
HAVA	-	"	α	-	"	Wüstenwaran (<i>Varanus griseus</i>)
HBVA1	-	"	β^1	-	"	" " " " " "
HBVA2	-	"	β^2	-	"	" " " " " "
HAUH1	-	"	α^1	-	"	Eidechse (<i>Uromastix hardwickii</i>)
HAUH2	-	"	α^2	-	"	" " " " " "
HBUN1	-	"	β^1	-	"	" " " " " "
HBUN2	-	"	β^2	-	"	" " " " " "
HAAK	-	"	α	-	"	Nilkrokodil (<i>Crocodylus niloticus</i>)
HBAK	-	"	β	-	"	" " " " " "
HAAQ	-	"	α	-	"	Alligator (<i>Alligator mississippiensis</i>)
HEAQ	-	"	β	-	"	" " " " " "
HACQ	-	"	α	-	"	Caiman (<i>Caiman crocodylus</i>)
HBCQ	-	"	β	-	"	" " " " " "
HASN	-	Viper	α	-	"	Viper (<i>Vipera aspis</i>)
HABN	-	"	α	-	"	Bullennatter (<i>Pituophis melanoleucus</i>)
HEBN	-	"	β	-	"	" " " " " "
HAIN	-	"	α	-	"	Indigonatter (<i>Drymarchon corais erebennus</i>)
HBIN1	-	"	β^1	-	"	" " " " " "
HBIN2	-	"	β^2	-	"	" " " " " "
HAFY	-	"	α	-	"	Tigerpython (<i>Python molurus bivittatus</i>)
HBPY	-	"	β	-	"	" " " " " "

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Hämoglobinen der Reptilia. Untersucht wurden:

Die Zierschildkröte (*Chrysemys picta bellii*, Unterordnung Cryptodirae),

Die Krötenkopfschildkröte (*Phrynos hylarii*, Unterordnung Pleurodirae),

Der Grüne Leguan (*Iguana iguana*, eine Eidechse, Ordnung Squamata, Unterordnung Sauria).

Die Primärstrukturen der Globinketten werden beschrieben. Insgesamt wird die vollständige Sequenz von 6 Ketten - 2 α^A -, 2 α^D - und 2 β -Ketten - wiedergegeben; der Blutfarbstoff des Wustenwarans (*Varanus griseus*) wurde in der Diplomarbeit partiell analysiert. Die Sequenzen werden hinsichtlich der Atmungsphysiologie, der Genexpression sowie der Systematik der Reptilien diskutiert.

2. Hämoglobine von *Chrysemys picta bellii*

Aus elektrophoretischen und chromatographischen Analysen geht hervor, daß im Blut adulter Tiere zwei Komponenten HbA und HbD mit unterschiedlichen α -Ketten im ungefähren Verhältnis von 5 : 2 vorkommen. Die Kettentrennung erfolgte mittels Chromatographie an CM-Cellulose und mittels HPLC an RP2 LiChrosorb. Die α -Ketten der Nebenkompente HbD gehören dem bisher nur bei Vögeln beschriebenen α^D -Typ an, während die der Hauptkomponente HbA zum α^A -Typ zu rechnen sind. Die Sequenzen von α^A -, α^D - und β -Ketten wurden komplett erarbeitet.

3. Hämoglobine von *Phrynosoma marmoratus*

Mit elektrophoretischen Methoden werden zwei Komponenten C I und C II (Verhältnis ca. 1 : 1) nachgewiesen. Die α -Ketten von C II konnten als α^D -Ketten identifiziert werden. Sie wurden mittels HPLC aus Gesamthämolyolat sowie aus Hb-CII-Lösung isoliert. Die komplette Sequenz der α^D -Ketten ist wiedergegeben. Sie wurde anhand tryptischer, hydrolytischer und der Bromcyan-Peptide ermittelt.

Die β -Ketten von C II sind N-terminal blockiert.

4. Hämoglobine von *Iguana iguana*

Elektrophoretische Untersuchungen ergeben einen überraschenden Polymorphismus. Mindestens zwei Hämoglobinkomponenten von großer Instabilität liegen vor. Durch Chromatographie des Globins an CM-Cellulose wurden α -Ketten, zwei unterschiedliche β -Ketten sowie Aggregate aus nicht näher charakterisierten Ketten isoliert. Chromatographische Verfahren der Komponententrennung erlaubten keine eindeutige Zuordnung der isolierten Ketten. Die Primärstrukturen der α -Ketten und eines Typs der β -Ketten wurden anhand der tryptischen Peptide und eines Bromcyanpeptids mittels homologen Vergleichs aufgeklärt.

5. Bei den Crocodylia wurde die direkte allosterische Wechselwirkung von O_2 und CO_2 (als Hydrogencarbonat) gefunden. Dieser einfache Kontrollmechanismus wurde auch für andere Reptilien postuliert. Die vorgelegten Sequenzdaten und andere eigene Versuche (Diplomarbeit) schließen jedoch diesen Mechanismus eindeutig aus. Die gefundenen Bindungs-

stellen entsprechen weitgehend den bisher vorgeschlagenen für organische Polyphosphate (ATP, GTP, IPP). Es stellt sich jedoch die Frage wie Leucin H21(143) β bei *Chrysemys picta bellii* an einer dieser Bindungsstellen für das ATP mit der beobachteten starken Phosphatabhängigkeit der Sauerstoffaffinität dieser Hämoglobine in Einklang gebracht werden kann.

6. Besondere Beachtung verdient der Nachweis der α^D -Ketten bei zwei Spezies der Schildkröten. Ketten dieses Typs werden sonst nur bei Vögeln gefunden. Der Vergleich der Amnioten-Hämoglobine läßt eine erstaunlich große Homologie zwischen denen der Schildkröten und denen der Vögel erkennen. α^D - wie auch α^A -Ketten der verschiedenen Spezies sind sich ähnlicher als α^D - und α^A -Ketten der gleichen Art: Die Divergenz von Schildkröten und Vögeln ist jünger als die Genduplikation, die zu den α^A - und den α^D -Genen führte. Über die Bedeutung dieses völlig unerwarteten Ergebnisses, z.B. für die Systematik der Reptilia - im Besonderen der Schildkröten - sowie der Vögel, können bislang erst Vermutungen angestellt werden.

7. Die bizarre Morphologie der Leguane spiegelt sich in der ungewöhnlichen Sequenz der Hämoglobine wieder. Aufgrund der geringen Homologie der Globinketten von *Iguana iguana* mit denen anderer Reptilien wird ein sehr alter Ursprung der Squamata diskutiert.

VI. L I T E R A T U R

- (1) Cannan, R.K. (1958) Science 127, 1376-1378
- (2) Rossi-Fanelli, A. & Antonini, E. (1958) Biochim. Biophys. Acta 30, 608-615
- (3) Teale, F.W.J. (1959) Biochim. Biophys. Acta 35, 543
- (4) Reischl, E., Höhn, M., Jaenicke, R. & Bauer, C. (1984) Comp. Biochem. Physiol. 78 B 251-257
- (5) Clegg, J.B., Naughton, M.A. & Weatherall, D.J. (1965) Nature 207, 945-947
- (6) Aschauer, H., Sanguanserm Sri, T. & Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1159-1162
- (7) Davis, B.J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427
- (8) Rovera, G., Magarian, C. & Borun, T.W. (1978) Anal. Biochem. 85, 506-518
- (9) Hirs, C.H.W. (1956) J. Biol. Chem. 219, 611-621
- (10) Dixon, H.B.F. & Perham, R.N. (1968) Biochem. J. 109, 312-314
- (11) Hirs, C.H.W. (1967) Methods Enzymol., Vol.XI, 218
- (12) Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) Anal. Biochem. 69, 468-473
- (13) Gross, E. & Wittkop, B. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 1510-1511
- (14) Kratzin, H., Yang, C., Krusche, J.U. & Hilschmann, N. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1591-1598
- (15) Oberthür, W., Wiesner, H. & Braunitzer, G. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 51-59
- (16) Spackman, D.H., Stein, W.H. & Moore, S. (1958) Anal. Chem. 30, 1190-1206
- (17) Matsubara, H. & Sasaki, R.M. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 175-181
- (18) Dagliesh, C.E. (1952) Biochem. J. 52, 3
- (19) Edman, P. & Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91
- (20) Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Scheithauer, U. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 137-146
- (21) Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730-1732

- (22) Braunitzer, G. & Schrank, B. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351. 417
- (23) Pflutschinger, J. & Braunitzer, G. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361. 925-931
- (24) Zimmermann, C.L. & Pisano, J.J. (1977) Methods Enzymol. 47. 45-51
- (25) Sullivan, B. & Riggs, A. (1967) Comp. Biochem. Physiol. 23. 437-447
- (26) Sullivan, B. & Riggs, A. (1967) Comp. Biochem. Physiol. 23. 449-458
- (27) Ultsch, G.R. & Jackson, D.C. (1982) J. exp. Biol. 96. 11-28
- (28) Jackson, D.C. & Heisler, N. (1983) Resp. Physl. 53. 187-201
- (29) Jackson, D.C. & Ultsch, G.R. (1982) J. exp. Biol. 96. 29-43
- (30) Ultsch, G.R. & Jackson, D.C. (1982) J. exp. Biol. 97. 87-99
- (31) Maginniss, L.A., Ultsch, G.R., Jackson, D.C. & Reeves, R.B. (1982) Fed. Proc. 41. 1095
- (32) Wood, S.C. & Johansen, K. (1972) Nature New Biol. 237. 278-279
- (33) Chanutin, A. & Curnish, R.R. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121. 96-102
- (34) Benesch, R. & Benesch, R.E. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 26. 161-167
- (35) Arnone, A. (1972) Nature (London) 237. 146-149
- (36) Arnone, A. & Perutz, M.F. (1974) Nature (London) 249. 34-36
- (37) Perutz, M.F. & Brunori, M. (1982) Nature (London) 299. 421-426
- (38) Weber, R. et al. unveröffentlicht
- (39) Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Cormick, J. & Jones, R.T. (1963) Biochem. 2. 992-1008
- (40) Frier, J.A. & Perutz, M.F. (1977) J. Mol. Biol. 112. 97-112
- (41) Braunitzer, G. (1979) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360. 1237-1242

- (42) Zak, S.J., Brimhall, B., Jones, R.T. & Kaplan, M.E. (1974) *Blood* 44, 543-549
- (43) Fermi, G. & Perutz, M.F. (1981) Clarendon Press, Oxford: *Atlas of Molecular Structures in Biology*, Vol.2. Haemoglobin and Myoglobin
- (44) Perutz, M.F., Kilmartin, J.V., Nishikura, K., Fogg, J.H., Butler, P.J.G. & Rollemas, H.S. (1980) *J. Mol. Biol.* 138, 649-670
- (45) Kilmartin, J.V., Breen, J.J., Roberts, G.C.K. & Ho, C. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 70, 12276-1279
- (46) Perutz, M.F. & Imai, K. (1980) *J. Mol. Biol.* 136, 183-191
- (47) Benesch, R., Edalji, R. & Benesch, R.E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 393, 368-372
- (48) Jenssen, M., Oski, F.A., Nathan, D.G. & Bunn, H.F. (1975) *J. Clin. Inv.* 55, 469-477
- (49) O'Donnell, S., Mandaro, R., Schuster, T.M. & Arnone, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12204-12208
- (50) Leclercq, F., Schnek, A.G., Braunitzer, G., Stangl, A. & Schrank, B. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 1151-1158
- (51) Rodewald, K. & Braunitzer, G. (1984) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 95-101
- (52) Hilse, K. & Braunitzer, G. (1968) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349, 433-450
- (53) Oberthür, W., Godovac-Zimmermann, J. & Braunitzer, G. (1984) *Hemoglobin* (Schnek, A.G. & Paul, C.) Editions de l'Universite de Bruxelles, Brussels, 365-375
- (54) Bieber, F.A. & Braunitzer, G. (1984) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365 321-334
- (55) Dayhoff, M.O. & Orcutt, B.C. (1982) NBR Report 820535-08710, Document Date. Protein Sequence Database. Version 5.
- (56) Oberthür, W., Voelter, W. & Braunitzer, G. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 969-975
- (57) Reischl, E., Hampe, O.G. & Crestana, R.H. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 77 B, 207-210
- (58) Tondo, C., Bonaventura, J., Bonaventura, C., Brunori, M., Amiconi, G. & Antonini, E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 342, 15-20

- (59) Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Wiesner, H. (1979) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 390, 1941-1946
- (60) Moberly, W.R. (1968) Comp. Biochem. Physiol. 27, 21-32
- (61) Wood, S.C. & Moberly, W.R. (1970) Resp. Physl. 10, 20-29
- (62) Guttman, S.I. (1971) J. Herpetol. 5, 11-16
- (63) Nishikura, K. (1978) Biochem. J. 173, 651-657
- (64) Jones, R.T. & Shih, T.-B. (1980) Hemoglobin 4, 243-261
- (65) Naqvi, S., Zaidi, Z.H., Bahr-Lindström v., H., Carlquist, M. & Jörnvall, H. (1983) FEBS Lett. 162, 290-295
- (66) Sinet, M., Bohn, B., Guesnon, P. & Poyart, C. (1982) Biochim. Biophys. Acta 708, 105-111
- (67) Perutz, M.F., Bauer, C., Gros, G., Leclercq, F., Vandecasserie, C., Schnek, A.G., Braunitzer, G., Friday, A.E. & Joysey, K.A. (1981) Nature (London) 291, 682-684
- (68) Bauer, C. & Jelkmann, W. (1977) Nature (London) 269, 825-827
- (69) Takei, H., Ota, Y., Wu, K., Kihohara, T. & Matsuda, G. (1975) J. Biochem. 77, 1345-1347
- (70) Braunitzer, G. & Godovac, J. (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 229-238
- (71) Rücknagel, K.P. unveröffentlicht
- (72) Duguët, M., Chauvet, J.-P. & Acher, R. (1974) FEBBS Lett. 47, 333-337
- (73) Bittner, M. unveröffentlicht
- (74) Chapman, B.S., Tobin, A.J. & Hood, L.E. (1982) J. Biol. Chem. 257, 651-658
- (75) Dodgson, J.B., McCune, K.C., Rusling, D.J., Krust, A. & Engel, D.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5998-6002
- (76) Engel, J.D., Rusling, D.J., McCune, K.C. & Dodgson, J.B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1392-1396
- (77) Dodgson, J.B. & Engel, J.D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4623-4629
- (78) Erbil, C. & Niessing, J. (1982) Gene 20, 211-217
- (79) Erbil, C. & Niessing, J. (1983) Embo J. 2, 1339-1343

- (80) McCutcheon, F.H. (1947) J. Cell. comp. Physiol. 29, 333-344
- (81) Isaacks, R.E., Harkness, D.R. & Witham, P.R. (1978) Devl. Biol. 62, 344-353
- (82) Vasse, J. & Beaupain, D. (1981) J. Embryol. exp. Morph. 62, 129-138
- (83) Goodman, M. 1982 Macromolecular Sequences in Systematic and Evolutionary Biology, Plenum Press, New York
- (84) Aschauer, H., Schäfer, W., Sanguanserm Sri, T. & Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1657-1659
- (85) Chapman, B.S., Tobin, A.J. & Hood, L.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9051-9059
- (86) Romer, A.S. & Parsons, T.S., Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere, Verlag P. Parey, Hamburg u. Berlin, (1983)
- (87) Colbert, E.H., Die Evolution der Wirbeltiere, Verlag Gustav Fischer, (1965)
- (88) Lovtrup, S., The phylogeny of vertebrata, John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto
- (89) Gardiner, B.G. (1982) Zool. J. Linn. 74, 207-232
- (90) Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. & Wittmann-Liebold, B. (1961) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 283-286
- (91) Lottspeich, F. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829-1834
- (92) Orcutt, B.C., Dayhoff, M.O. & Barker, W.C. (1982) NBR Report 820501-08710, Document Date, Alignment Score Program

Lebenslauf

Name: Rücknagel, Karl Peter
Geburtsdatum: 8.12.1955 in Peiting
Vater: Karl Rücknagel
Mutter: Helga Rücknagel (geb. Hemmel)
Staatsangehörigkeit: deutsch

1961-1965 Volksschule Peiting
1965-1974 math. nat. Gymnasium Schongau
1974-1975 Zivildienst
1975 Beginn des Chemiestudiums an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München
1981 Diplom
1981-1984 Dissertation am Max-Planck-Institut
für Biochemie in Martinsried bei
München unter der Leitung von Herrn
Prof. Dr. G. Braunitzer

